



TUGAS AKHIR SB-091358

PENGARUH MASA INKUBASI DAN KONSENTRASI INOKULUM *Penicillium* sp. TERHADAP AKTIVITAS ENZIM SELULASE PADA MEDIUM TONGKOL JAGUNG

AZIZAH RAHAYU
1507100063

Dosen Pembimbing
Nengah Dwianita Kuswytasari, S.Si., M.Si

Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya 2014



FINAL PROJECT SB-091358

THE EFFECT OF *Penicillium* sp. INCUBATION PERIOD AND INOCULUM CONCENTRATION TO CELLULASE ACTIVITIES OF CORNCOB MEDIUM

AZIZAH RAHAYU
1507100063

Supervisor
Nengah Dwianita Kuswytasari, S.Si., M.Si

Biology Department
Faculty Of Mathematic and Natural Science
Sepuluh Nopember Institute Of Technology
Surabaya 2014

LEMBAR PENGESAHAN

PENGARUH MASA INKUBASI DAN KONSENTRASI INOKULUM *Penicillium* sp. TERHADAP AKTIVITAS ENZIM SELULASE PADA MEDIUM TONGKOL JAGUNG

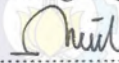
TUGAS AKHIR

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Sarjana Sains
pada
Jurusan S-1 Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh :

AZIZAH RAHAYU
NRP. 1507 100 063

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir :

N. D. Kuswytasari, S.Si., M.Si.  (Pembimbing 1)

Surabaya, 13 Agustus 2014

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi


Dr. rer. nat. Ir. Maya Shovitri, M. Si
NIP. 19690907 199803 2 001

**PENGARUH MASA INKUBASI DAN KONSENTRASI
INOKULUM *Penicillium* sp. TERHADAP AKTIVITAS ENZIM
SELULASE PADA MEDIUM TONGKOL JAGUNG**

Nama Mahasiswa : Azizah Rahayu
NRP : 1507 100 063
Jurusan : Biologi
Dosen Pembimbing : N.D Kuswytasari, S.Si., M.S.i

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas enzim selulase dengan variasi masa inkubasi (4 hari, 8 hari, 12 hari, 16 hari dan 20 hari) dan konsentrasi inokulum yang berbeda (10%, 15% dan 20%) dengan isolat Penicillium sp.. Jenis enzim selulase yang diukur adalah aktivitas enzim endoglukanase, eksoglukanase dan Fp-ase dengan menggunakan metode DNS dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada jenis medium pertama, aktivitas enzim paling optimum adalah pada aktivitas enzim Fp-ase pada konsentrasi inokulum 20% dengan masa inkubasi hari ke 8 sebesar 42,2619 U/ml. Diikuti dengan aktivitas eksoglukanase yakni 11,3525 U/ml pada konsentrasi 10% dan aktivitas enzim endoglukanase sebesar 3,4904 U/ml pada konsentrasi inokulum 15% dengan masa inkubasi hari ke 4. Sedangkan pada jenis medium kedua, aktivitas Fp-ase adalah yang tertinggi, yakni pada konsentrasi 20% dengan masa inkubasi hari ke 16 sebesar 34,9702 U/ml. Diikuti dengan aktivitas enzim eksoglukanase 11,1408 U/ml yang optimum pada konsentrasi 15% dengan masa inkubasi hari ke 4 dan aktivitas enzim endoglukanase sebesar 7,7066 U/ml dengan konsentrasi inokulum 15% pada masa inkubasi hari ke 16.

Kata kunci: selulase, Penicillium sp., aktivitas enzim selulase, masa inkubasi, konsentrasi inokulum.

THE EFFECT OF FERMENTATION PERIOD AND *Penicillium*
sp. INOCULUM'S CONCENTRATION TO CELLULOSE
ENZYME ACTIVITIES OF CORNCOB MEDIUM

Student Name : Azizah Rahayu
NRP : 1507 100 063
Department : Biologi
Supervisor : N.D Kuswytasari, S.Si., M.S.i

Abstract.

The objectives this research is to find out the cellulose enzyme activities with the variations of incubation period (4 days, 8 days, 12 days, 16 days and 20 days) and different inoculum concentrations (10%, 15% and 20%) with *Penicillium* sp. isolated. The kind of cellulose enzymes measured were endoglukanase enzyme activities, eksoglukanase and Fp-ase with DNS method and the absorbantion measured at 540 nm.

The results show that the type of the first medium, the optimum enzyme activities is Fp-ase enzyme at 20% concentration with 8 days incubation period by 42,2619 U/ml. Followed by the eksoglukanase activity 11,3525 U/ml at 10% concentration and endoglukanase activity 3,4904 U/ml at 15% concentration 4 days incubation period. While in the second type medium, Fp-ase activities is highest, at 20% concentration with 16 days incubation period by 34,9702 U/ml. Followed by eksoglukanase enzyme activities at 15% concentration with 4 days incubation period by 11,1408 U/ml and andoglukanase enzyme activities at 15% concentration with 16 days incubation period by 7,7066 U/ml.

Keywords : cellulose, *Penicillium* sp., cellulose enzyme activities, incubation period, inoculum concentration.

KATA PENGANTAR

Segala puji hanya milik Allah SWT, Tuhan pemilik segala ilmu pengetahuan. Rasa syukur yang sangat besar kepada Allah SWT atas petunjuknya dan limpahan rahmat serta kasih sayang-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan Tugas Akhir dengan judul **Pengaruh Masa Inkubasi dan Konsentrasi Inokulum *Penicillium* sp. Terhadap Aktivitas Enzim Selulase Pada Medium Tongkol Jagung** yang dilakukan pada bulan Januari sampai dengan Juli 2014. Penyusunan Tugas Akhir ini merupakan suatu syarat untuk memperoleh gelar kesarjanaan strata 1 (S1) pada Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

Penghargaan dan terima kasih penulis sampaikan kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan Tugas Akhir ini, diantaranya Ibu Nengah Dwianita Kuswytasari, S.Si., M.Si. selalu dosen pembimbing yang selalu memberikan masukan dan meluangkan waktu bagi penulis untuk berkonsultasi. Ibu Dr.rer.nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si, dan Bapak Aunurohim, M.Si., DEA selaku dosen penguji yang telah berkenan meluangkan waktu untuk menguji, memberikan saran dan masukan. Bapak dan Ibu tercinta, sa udara, dan seluruh keluarga yang selalu memberikan doa, inspirasi, pengorbanan dan dukungan. Suami tersayang, terima kasih atas segala pengorbanan dan kesabaranmu. Serta semua pihak yang telah membantu penulis.

Walaupun penulis menyadari masih banyak kekurangan, namun besar harapan Tugas Akhir ini dapat bermanfaat.

Surabaya, Agustus 2014

Azizah Rahayu

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	iii
ABSTRAK	iv
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Permasalahan	2
1.3 Batasan Masalah	2
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kapang	5
2.1.1 Kapang <i>Penicillium</i> sp.	6
2.1.2 Kurva pertumbuhan mikroorganisme	8
2.2 Selulosa	9
2.3 Enzim	10
2.3.1 Klasifikasi enzim	11
2.3.2 Mekanisme kerja enzim	12
2.3.3 Spesifikasi enzim	16
2.3.4 Aktivitas enzim	16
2.3.5 Satuan unit aktivitas enzim	19
2.4 Enzim Selulase	19
2.4.1 Enzim endoglukanase	21

2.4.2 Enzim eksoglukanase	21
2.4.3 Enzim β -glukosidase	22
2.5 Mekanisme Degradasi Selulosa	22
2.6 Limbah Tongkol Jagung	23
2.7 <i>Pretreatment</i>	24
2.8 Fermentasi Media Padat	26

BAB III METODOLOGI

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	29
3.2 Alat, Bahan dan Cara Kerja	29
3.2.1 Isolat kapang	29
3.2.2 Bahan penelitian	29
3.2.3 Alat penelitian	29
3.3 Prosedur Kerja	30
3.3.1 Pembuatan larutan	30
3.3.2 Pembuatan medium.....	31
3.3.3 Persiapan substrat alam	32
3.3.4 Peremajaan kapang	32
3.3.5 Preparasi inokulum <i>Penicillium</i> sp.	33
3.3.6 Optimasi enzim selulase	33
3.3.7 Ekstraksi enzim kasar	34
3.3.8 Pembuatan kurva standar glukosa	34
3.3.9 Uji aktivitas enzim selulase	34
3.4 Rancangan Penelitian	38
3.5 Analisa Data	39

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kapang Penghasil Selulase	41
4.2 Persiapan Substrat Alam	42
4.3 Preparasi Starter <i>Penicillium</i> sp. dan Optimasi Enzim Selulase	44

4.4 Pengaruh Masa Inkubasi dan Konsentrasi Inokulum Terhadap Aktivitas Enzim Selulase	45
--	----

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan	53
5.2 Saran	53
DAFTAR PUSTAKA	55
LAMPIRAN	64

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Substrat dan Prosedur Untuk Uji Aktivitas	21
Tabel 2.2 Karakteristik dan Komponen Tongkol Jagung	24
Tabel 2.3 <i>Pretreatment</i> Bahan Lignoselulosa.....	25
Tabel 3.1 Komposisi Medium Dasar Pertumbuhan	31
Tabel 3.2 Aktivitas Enzim Selulase (IU/ml) Pada Substrat Pertama (Substrat Tongkol Jagung dengan <i>Treatment</i> Mekanik)	38
Tabel 3.3 Aktivitas Enzim Selulase (IU/ml) Pada Substrat Kedua (Substrat Tongkol Jagung dengan <i>Treatment</i> Mekanik dan Kimiawi)	39
Tabel 4.1 Aktivitas Enzim Selulase Terhadap Beberapa Masa Inkubasi dan Konsentrasi Inokulum Pada Medium Pertama	47
Tabel 4.2 Aktivitas Enzim Selulase Terhadap Beberapa Masa Inkubasi dan Konsentrasi Inokulum Pada Medium Kedua	48

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Penampakan Mikroskopis <i>Penicillium</i> sp.	6
Gambar 2.2. Struktur Morfologi dan Tipe Konidiofor <i>Penicillium</i> sp.	7
Gambar 2.3. Kurva Pertumbuhan Fungi	9
Gambar 2.4. Struktur Selulosa	10
Gambar 2.5. Kurva Penurunan Energi Aktivasi Oleh Adanya Enzim	12
Gambar 2.6. Interaksi Substrat dan Enzim Model <i>Lock and Key</i>	14
Gambar 2.7. Interaksi Substrat dan Enzim Model <i>Induced Fit</i>	15
Gambar 2.8. Kurva Pengaruh Konsentrasi Enzim Terhadap Laju Reaksi	17
Gambar 2.9. Kurva Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Laju Reaksi	17
Gambar 2.10. Kurva Pengaruh Temperatur Terhadap Laju Reaksi	18
Gambar 2.11. Kurva Pengaruh pH Terhadap Laju Reaksi	19

Gambar 2.12.	Struktur Enzim Selulase. (A) Struktur Enzim Selulase dan (B) Sisi Aktif Enzim	20
--------------	---	----

Gambar 2.13.	Mekanisme Hidrolisis Selulosa	23
--------------	-------------------------------------	----

Gambar 4.1	Isolat Murni dari Kapang <i>Penicillium</i> sp.	41
------------	---	----

Gambar 4.2	<i>Treatment</i> Substrat dengan NaOH 2%	43
------------	---	----

Gambar 4.3	Pertumbuhan Strarter Kapang <i>Penicillium</i> sp.	45
------------	--	----

Gambar 4.4	Reaksi DNS dengan Gula Pereduksi	46
------------	---	----

Gambar 4.5	Grafik Aktivitas Enzim Selulase Pada Medium Pertama	49
------------	--	----

Gambar 4.6	Grafik Aktivitas Enzim Selulase Pada Medium Kedua	50
------------	--	----

Lampiran 1 :	Diagram Alur Penelitian	63
Lampiran 2 :	Pembuatan Kurva Standar Glukosa	64
Lampiran 3 :	Perhitungan Aktivitas Enzim Endoglukanase	65
Lampiran 4 :	Perhitungan Aktivitas Enzim Eksoglukanase	66
Lampiran 5 :	Perhitungan Aktivitas Enzim Fp-ase	67

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Selulase dapat digunakan secara luas dalam industri tekstil, deterjen, pulp maupun kertas. Selulase juga dapat digunakan dalam pengolahan kopi (Frazier dkk., 1988). Selain itu, selulase dapat dimanfaatkan dalam proses inkubasi menjadi biofuel, seperti bioethanol (Zhiliang Fan dkk., 2006). Dengan banyaknya kebutuhan terhadap enzim selulase, maka perlu ditemukan sumber penghasil enzim selulase. Produksi enzim selulase secara komersial biasanya menggunakan fungi atau bakteri. Pemilihan mikroba sebagai sumber enzim mempunyai beberapa keuntungan. Diantara keuntungan tersebut adalah sistem produksi mikroba dapat diperoleh di bawah kontrol tertutup, produktivitas enzim dapat dimanipulasi secara lingkungan dan genetika, serta metode pengkayaan untuk sistem mikroba cukup sederhana (Fowler, 1988).

Secara komersial, harga enzim sangat mahal dikarenakan mahalnya harga substrat untuk produksi enzim tersebut. Sehingga permasalahan yang sering muncul dalam hidrolisis selulosa secara enzimatis adalah kurang tersedianya enzim selulase yang murah dan efisien. Untuk itu perlu dicari media pengganti untuk menghasilkan enzim tersebut. Terdapat banyak penelitian mengenai produksi enzim selulase diantaranya pemanfaatan limbah pertanian seperti enceng gondok, tongkol jagung, jerami padi dan bagase tebu sebagai substrat produksi enzim oleh Alfiah (2012).

Indonesia menghasilkan limbah lignoselulosa dari pertanian seperti jagung dan padi dengan produksi tanaman jagung sebesar 18,83 juta ton/tahun dan produksi padi sebesar 69 juta ton/tahun pada tahun 2012-2013 (Badan Pusat Statistik, 2013). Limbah dari hasil pertanian tersebut memiliki komponen utama lignoselulosa yang terdiri atas selulosa, hemiselulosa dan lignin. Dengan banyaknya kandungan lignoselulosa terutama

selulosa, maka bahan-bahan tersebut sangat potensial jika dimanfaatkan untuk memproduksi enzim selulase. Seperti pada tongkol jagung yang mengandung selulosa sebanyak 41%, hemiselulosa 36% dan lignin 6% (Irawadi, 1990).

Proses produksi enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, derajat keasaman dan suhu (Stryer *et al.*, 2002). Menurut penelitian Astutik (2011), aktivitas enzim selulase tertinggi didapatkan pada *Penicillium* sp. yang telah diisolasi dari kawasan pesisir Wonorejo Surabaya oleh peneliti sebelumnya (Kuswytasari *et al.*, 2011) dengan menggunakan media *Cellulose Congo Red Agar* (CCRA). Sedangkan menurut Alfiah (2012), aktivitas selulase tertinggi untuk *Penicillium* sp. adalah dalam medium tongkol jagung, jika dibandingkan dengan medium bagas tebu, enceng gondok dan medium jerami padi. Berdasarkan penelitian tersebut, diperoleh data bahwa aktivitas enzim tertinggi didapat dari perlakuan dengan pH 6 dan suhu 35°C (Alfiah, 2012).

Oleh karena itu perlu diketahui tingkat dosis/konsentrasi dan lama inkubasi yang tepat untuk mengetahui aktivitas enzim terbaik.

1.2 Permasalahan

Permasalahan yang akan diangkat pada penelitian ini adalah bagaimana pengaruh masa inkubasi dan konsentrasi inokulum *Penicillium* sp. terhadap aktivitas enzim selulase dengan menggunakan medium tongkol jagung.

1.3 Batasan Masalah

Penelitian ini membatasi masalah yang akan dibahas :

1. Isolat yang digunakan adalah *Penicillium* sp. koleksi laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi ITS yang diisolasi dari kawasan pesisir Wonorejo Surabaya.
2. Jenis medium tongkol jagung yang digunakan terdapat dua jenis, yakni medium dengan *treatment* mekanik, dan medium dengan *treatment* mekanik dan kimiawi.

3. Inkubasi dikondisikan pada suhu 35°C dengan pH 6.
4. Aktivitas enzim diukur pada panjang gelombang 540 nm.

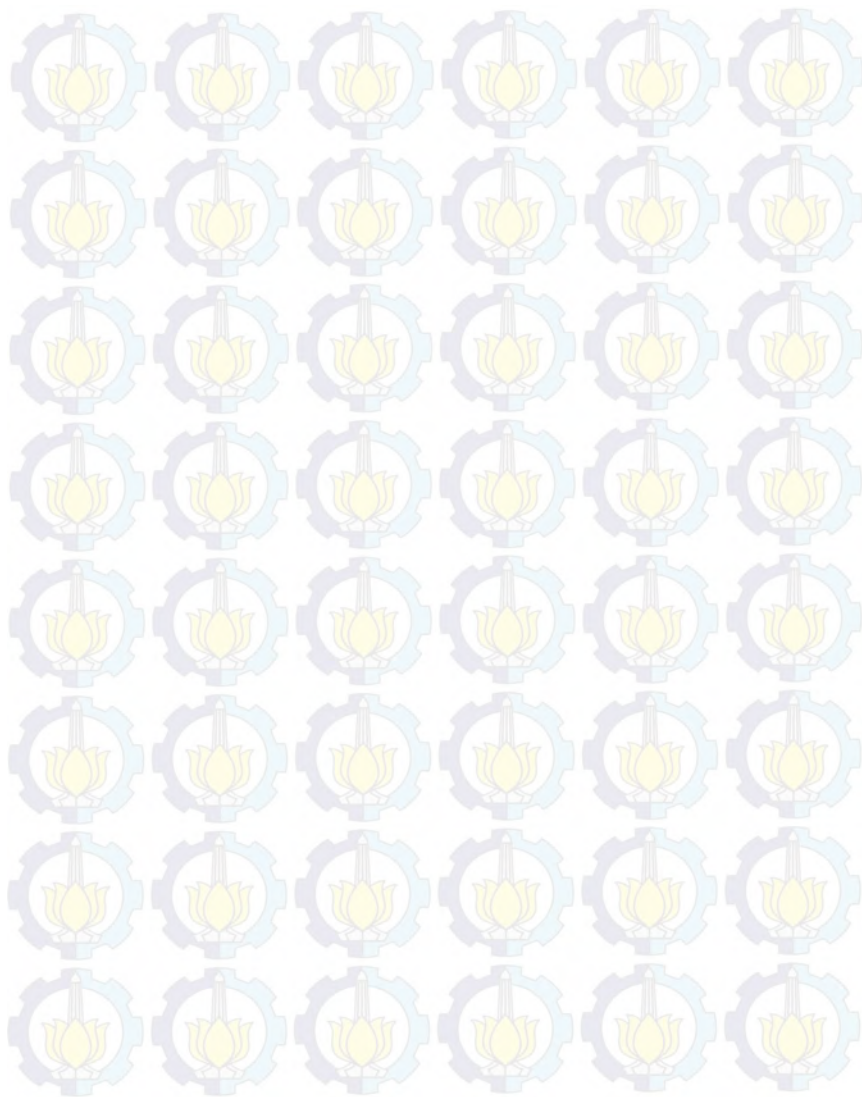
1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan lama inkubasi dan konsentrasi inokulum yang tepat oleh *Penicillium* sp. terhadap aktivitas enzim selulase dengan menggunakan medium tongkol jagung.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan memberi informasi tentang aktivitas enzim selulase terbaik dari isolat *Penicillium* sp. dengan variasi konsentrasi inokulum dan masa inkubasi yang berbeda pada medium tongkol jagung. Dimana enzim selulase ini sangat berguna untuk diaplikasikan pada berbagai jenis industri.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kapang

Kapang merupakan bagian dari fungi yang tidak berklorofil, berdinding sel dari kitin/selulosa dan keberadaannya mudah dikenali. Bagian vegetatif kapang berupa meselium mudah dilihat pada substrat yang membusuk. Karakteristik kapang adalah merupakan cendawan renik dengan ukuran 2-10 μm meskipun ada beberapa yang dapat mencapai ukuran mm. Kapang merupakan cendawan eukariotik, bersifat multiseluler, dapat bereproduksi secara aseksual dan seksual, berbentuk filamen (seperti benang), merupakan mikroorganisme aerob dan bersifat heterotrof. Secara alami, kapang dapat berkembang biak dengan berbagai cara. Perkembangbiakan secara aseksual dapat dengan cara pembelahan sel, penguncupan, atau pembentukan spora. Perkembangbiakan secara seksual dapat dengan cara peleburan nukleus dari dua sel induknya. Kapang dapat bertahan dalam keadaan alam yang tidak menguntungkan dengan cara membentuk spora yang berdinding tebal (Pelczar dan Chan, 2005).

Kapang merupakan organisme heterotrofik dimana memerlukan senyawa organik untuk nutrisinya. Mereka tidak dapat melakukan fotosintesis sehingga untuk memenuhi kebutuhan energinya, kapang memproduksi enzim ekstraseluler (Wainwright, 1992). Beberapa kapang yang dapat hidup pada bahan yang mengandung lignoselulosa yang tinggi akan mengeluarkan enzim yang dapat mendegradasi bahan tersebut sebagai nutrisinya. Kapang ini akan mensekresikan enzim ekstraseluler yang dapat memecah ikatan kompleks pada bahan berlignoselulosa menjadi suatu senyawa yang sederhana sehingga lebih mudah masuk ke dalam sel (Herliyana *et al.*, 2008).

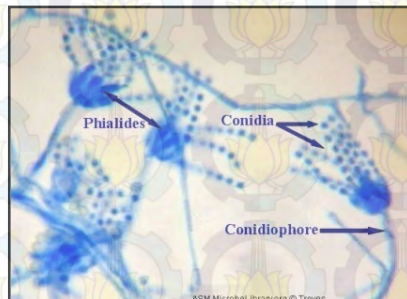
2.1.1 Kapang *Penicillium* sp.

Penicillium sp. merupakan salah satu genus dari Deuteromycetes. Kelompok Deuteromycetes disebut sebagai imperfect fungi karena reproduksi dan struktur seksualnya jarang dibentuk. Deuteromycetes membentuk spora aseksual yang disebut sebagai konidia. Miselium cendawan ini berkembang baik, bersepta dan bercabang (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Penicillium tumbuh pada berbagai substrat, seperti pada tanah, kayu, sampah kertas, buah, sayur dan susu (Moore, 1996). Suhu pertumbuhan jamur *Penicillium* sp. adalah 20-80 °C (Nwodo *et al.*, 2008; Kathiresan dan Manivannan, 2006) dan dapat tumbuh pada kisaran pH antara 2-9 (Sindhu, 2011). pH optimum untuk kedua fungi tersebut adalah pada rentang 5,0-7,0 (Ramli, 2009).

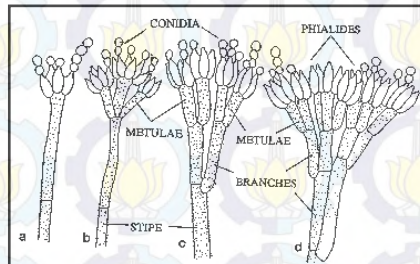
Dalam dunia fungi, *Penicillium* memiliki taksonomi sebagai berikut :

Kingdom	: Fungi
Filum	: Ascomycota
Kelas	: Eurotiomycetes
Ordo	: Eurotiales
Famili	: Trichocomaceae
Genus	: <i>Penicillium</i>
Spesies	: <i>Penicillium</i> sp.



Gambar 2.1 Penampakan Mikroskopis *Penicillium* sp. (Treves, 2005).

Penicillium mampu menghasilkan enzim berbagai enzim, diantaranya yaitu enzim selulase berupa endoglukanase, eksoglukanase dan β -glukosidase yang tinggi (Liu *et al.*, 2008; Long *et al.*, 2009). *Penicillium* memproduksi enzim selulase secara optimum pada pH 5.0 - 8.0 (Sindhu, 2011), pada pH 4 (Das, 2009), pH 5 (Desouky, 2007; Nwodo, 2008), pH 6 (Ng, 2010), pH 7 dan pH 8 (Pericin, 2008). Sedangkan temperatur optimum *penicillium* menghasilkan selulase adalah pada suhu 25 °C (Overy, 2005), suhu 28 °C (Camassola, 2009; Han, 2009), dan suhu 30 °C (Ng, 2010; Karthikeyan, 2010).



Gambar 2.2 Struktur Morfologi dan Tipe Konidiofor *Penicillium* sp. (Samson *et al.*, 1984).

Untuk spesies *Penicillium* sendiri, secara umum memiliki ciri-ciri:

- Hidup secara saprofit di berbagai tempat, terutama pada substrat yang mengandung gula.
- Hidup secara saprofit di berbagai tempat, terutama pada substrat yang mengandung gula.
- Berkembang biak secara vegetatif dengan membentuk konidia. Konidia dibentuk pada ujung hifa. Hifa pembawa konidia disebut konidiofor. Sehingga setiap konidia dapat tumbuh membentuk jamur baru.
- Konidiofornya berbentuk seperti sikat/kuas.
- Reproduksi generatif dengan membentuk askus, namun reproduksi secara generatif sulit ditemukan.

Selain menghasilkan enzim selulase, *Penicillium* juga menghasilkan beberapa enzim lain seperti enzim amylase yang berguna dalam dunia industri, seperti pada produk tekstil, pelarutan pati, dan produksi glukosa. Jenis enzim yang lain yakni enzim pektinase yang berperan dalam proses penjernihan anggur dan sari buah (Fowler M. W, 1988).

2.1.2 Kurva pertumbuhan mikroorganisme

Mikroorganisme dalam pertumbuhannya mengalami tahap-tahap tertentu. Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme adalah adanya nutrisi, sumber energi, air, temperatur, pH, kadar O_2 , cahaya, salinitas dan tekanan. Tahap-tahap dalam pertumbuhan mikroorganisme didasarkan atas penggunaan substrat dan biomassa yang dihasilkan. Pembuatan kurva pertumbuhan berguna untuk menentukan masa pertumbuhan mikroorganisme agar diperoleh kondisi sel yang optimum. Pertumbuhan mikroorganisme terdiri dari beberapa fase seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.3, antara lain :

1. Tahap adaptasi (fase lag)
Fase adaptasi merupakan fase penyesuaian, dimana fase ini tidak terjadi penambahan sel dan mikroorganisme hanya menyesuaikan diri dengan lingkungannya.
2. Fase pertumbuhan awal
Pada fase ini mikroorganisme mulai membelah dengan kecepatan yang masih rendah karena baru selesai dari tahap penyesuaian diri.
3. Fase pertumbuhan logaritmik (eksponensial)
Pada fase ini sel mulai membelah dengan cepat dan konstan serta membutuhkan energi lebih banyak dibandingkan dengan fase lainnya dan juga saling sensitif terhadap lingkungannya. Pada fase ini enzim-enzim dapat dipanen.
4. Fase pertumbuhan lambat (deselerasi) Pada fase pertumbuhan lambat ditandai dengan kecepatan pertumbuhan sel yang tidak lagi sebanding dengan waktu

karena jumlah nutrisi yang semakin berkurang.

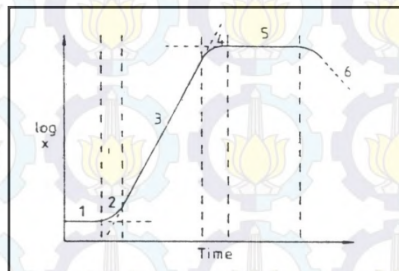
5. Fase pertumbuhan tetap (stasioner)

Pada fase stasioner, kecepatan penambahan dan pengurangan sel (mati) sebanding sehingga berat biomassa tetap. Biasanya pada fase ini terjadi perubahan pada kandungan nutrisi media pertumbuhan sehingga menyebabkan daya tahan mikroorganisme mulai menurun. Organisme-organisme tertentu akan menghasilkan metabolit sekundernya seperti antibiotika untuk mempertahankan diri diakhir fase stasioner ini.

6. Fase kematian

Pada fase ini pertumbuhan mikroorganisme mengalami penurunan dimana kandungan nutrisi sudah habis dan terjadi pengurangan sel (sel mati).

(Fardiaz, 1992).



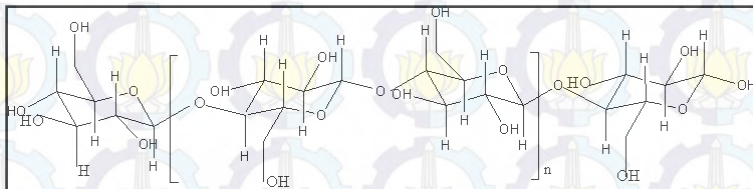
Gambar 2.3 Kurva Pertumbuhan Fungi.

Keterangan gambar : (1: fase lag; 2: fase pertumbuhan awal; 3: fase eksponensial, 4. fase deselerasi, 5: fase stationer; 6: fase kematian).

2.2 Selulosa

Selulosa adalah salah satu dari komponen utama dinding sel tumbuhan terutama dinding sekunder yang penting untuk kekuatan struktur. Selulosa adalah polimer linier satuan D-glukosa dengan ikatan β -1,4-glikosidik. Pada dinding sel molekul selulosa, molekul dikelompokkan sejajar satu sama lain membentuk mikrofibril (dengan diameter $45 \times 85 \text{ \AA}$) (Robinson, 1995). Mikrofibril-mikrofibril ini tersusun menjadi fibril.

Hidrolisis selulosa pertama-tama menghasilkan selodekstrin yang mengandung ± 30 monomer glukosa, kemudian menjadi selobiosa dan akhirnya menjadi glukosa. Jumlah glukosa dalam molekul selulosa suatu tumbuhan tidaklah sama. Semakin tua tumbuhan makin besar jumlah satuan glukosanya.



Gambar 2.4 Struktur Selulosa.

Selulosa (Gambar 2.4) merupakan komponen utama dinding sel tanaman dan hampir tidak pernah ditemui dalam keadaan murni di alam tetapi berikatan dengan komponen lain yaitu lignin dan hemiselulosa membentuk suatu lignoselulosa. Struktur berkrystal serta adanya lignin dan hemiselulosa disekeliling selulosa merupakan hambatan utama dalam menghidrolisis selulosa. Kristalisasi selulosa dan pengerasan fibril selulosa oleh lignin membentuk suatu senyawa lignoselulosa yang keras. Hidrolisis selulosa dan hemiselulosa pada bahan berlignoselulosa sangat sulit dilakukan kecuali lignin dilarutkan atau dihilangkan terlebih dahulu (Lynd *et al.*, 2002).

2.3 Enzim

Enzim adalah biokatalisator yang dihasilkan oleh sel yang bekerja secara spesifik mengkatalis perubahan kimia dalam sel. Enzim sangat penting dalam kehidupan karena semua reaksi metabolisme dikatalis oleh enzim. Jika tidak ada enzim atau aktivitas enzim terganggu maka reaksi metabolisme sel akan terhambat dan dalam waktu yang lama tidak akan ada kehidupan. Reaksi enzimatik dibutuhkan oleh mikroorganisme dengan mengeluarkan enzim ekstrasel agar dapat memperoleh makanan

dalam keadaan terlarut sehingga dapat diserap ke dalam sel untuk diproses dalam tubuh sehingga diperoleh energi yang dapat dipergunakan untuk melakukan aktivitas hidupnya (Price dan Lewis, 2006).

Sebagai katalis, enzim dapat meningkatkan kecepatan reaksi dengan cara menyediakan suatu jalur reaksi yang baru membentuk keadaan transisinya yang memiliki energi bebas yang lebih rendah sehingga lebih mudah dicapai dari pada reaksi tanpa katalis. Enzim dapat mempercepat reaksi 10³ sampai 10⁸ kali lebih cepat dari pada tanpa menggunakan katalis. Enzim dapat mengkatalis reaksi antara 100-1000 reaksi per detik (Wiseman, 1975). Enzim merupakan protein globular yang tersusun dari rantai polipeptida yang berlipat secara kompak. Pelipatan ini membentuk konformasi yang stabil karena ditunjang oleh berbagai ikatan seperti ikatan hidrogen yang terdapat diantara gugus samping residu asam amino rantai samping yang berdekatan, ikatan elektrostatik diantara gugus samping yang berlawanan, interaksi hidrofobik dari gugus samping asam amino non polar, dan ikatan kovalen berupa ikatan disulfida (Stryer *et al.*, 2002).

2.3.1 Klasifikasi enzim

Enzim diklasifikasikan menjadi enam kelas berdasarkan tipe reaksi yang dikatalisnya.

1. Oksidoreduktase adalah golongan enzim yang mengkatalis pemisahan dan penambahan elektron atau hidrogen.
2. Transferase adalah golongan enzim yang mengkatalis pemindahan gugus senyawa kimia.
3. Hidrolase adalah golongan enzim yang memutuskan ikatan kimia dengan penambahan air.
4. Liase adalah golongan enzim yang membentuk ikatan rangkap dengan melepas satu gugus kimia. Golongan enzim ini memutuskan berbagai ikatan kimia selain melalui hidrolisis dan oksidasi.

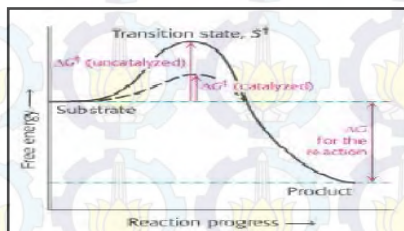
5. Isomerase adalah golongan enzim yang mengkatalis perubahan isomer.
6. Ligase adalah golongan enzim yang menggabungkan dua molekul yang disertai dengan hidrolisis ATP.

(Nelson dan Michael, 2003).

Enzim selulase termasuk enzim hidrolase yang dapat menguraikan selulosa menjadi glukosa. Enzim ini tidak hanya mengkatalis reaksi hidrolitik untuk memutuskan sebuah gugus dari substratnya tetapi juga mentransfer gugus tersebut ke molekul penerima yang sesuai. Aktivitas enzim ditentukan oleh gugus aktif pada rantai samping enzim. Proses katalisis hidrolisis selulosa oleh selulase terjadi pada sisi aktif asam amino glutamate (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 1992).

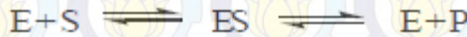
2.3.2 Mekanisme kerja enzim

Sebagai katalis biologi, enzim mempercepat reaksi dengan cara menciptakan suatu keadaan transisi terstabilisasi melalui pembentukan kompleks enzim-substrat yang mempunyai energi aktivasi lebih rendah. Energi aktivasi merupakan energi tertinggi yang harus dicapai agar suatu reaksi dapat terjadi. Dengan lebih rendahnya energi aktivasi maka berarti lebih banyak molekul yang dapat mencapainya sehingga reaksi berjalan lebih cepat.



Gambar 2.5 Kurva Penurunan Energi Aktivasi Oleh Adanya Enzim.

Sebelum melakukan fungsi katalitiknya, enzim terlebih dahulu membentuk ikatan dengan substrat, digambarkan dengan persamaan berikut :



Dimana E adalah enzim, S adalah substrat, ES adalah kompleks enzim substrat dan P adalah produk. Langkah pertama dalam proses katalisis adalah pembentukan senyawa intermediet kompleks enzim substrat. Substrat diikat pada daerah yang dinamakan sisi aktif enzim. Reaksi kimia yang terjadi dalam kompleks enzim substrat tersebut dapat dilanjutkan dengan pelepasan produk dan enzim (Stryer *et al.*, 2002).

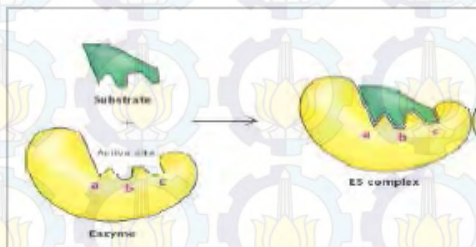
Mekanisme katalisis enzim merupakan reaksi-reaksi yang melibatkan gugus-gugus fungsi dari residu asam amino yang terdapat pada sisi aktif enzim. Sisi aktif enzim adalah tempat pengikatan substrat yang mengandung residu asam amino sebagai gugus katalitiknya dan secara langsung terlibat dalam pembuatan serta pemutusan ikatan selama proses katalisis (Stryer *et al.*, 2002).

Kompleks enzim-substrat berikatan melalui ikatan elektrostatik, ikatan hidrogen, gaya Van der Waals, dan interaksi hidrofobik. Ikatan yang terjadi antara enzim dan substrat ini merupakan ikatan yang lemah. Interaksi yang terjadi antara molekul enzim dan substrat melibatkan gugus reaktif baik dari enzim maupun dari substrat. Enzim hanya dapat mengikat substrat yang memiliki gugus reaktif yang sama (Stryer *et al.*, 2002).

Model interaksi enzim substrat dibedakan menjadi :

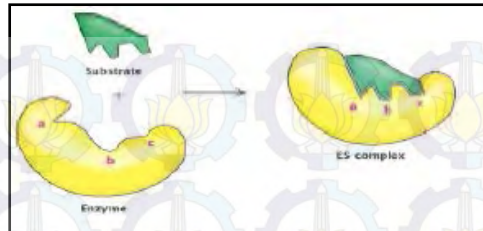
1. Model *Lock and Key* (lubang dan anak kunci) : dikemukakan oleh Emil Fischer pada tahun 1890. Pada model ini, spesifitas pengikatan tergantung pada ketepatan pengaturan atom-atom pada sisi aktif. Substrat dapat terikat pada enzim bila mempunyai ukuran atau bentuk yang sesuai dengan sisi aktif enzim (Gambar 2.6).

Karenanya model ini merupakan model cetakan yang kaku. Dalam model Fischer, tempat katalitik dianggap terbentuk terlebih dahulu agar sesuai dengan substratnya (Stryer *et al.*, 2002).



Gambar 2.6 Interaksi Substrat dan Enzim *Model Lock and Key* (Stryer *et al.*, 2002).

2. Model *Induced Fit* : dikemukakan oleh Daniel G. Koshland pada tahun 1958. Koshland mengemukakan bahwa ukuran atau bentuk sisi aktif enzim dapat mengalami modifikasi oleh adanya pengikatan substrat (Gambar 2.7). Pada model ini, sisi aktif enzim diasumsikan cocok dengan substratnya sesaat setelah enzim mengikat substrat. Jadi substrat dianggap mampu menginduksi perubahan bentuk dalam sisi aktif enzim. Perubahan ini menempatkan residu asam amino pada sisi aktif enzim yang memungkinkan terjadinya pengikatan substrat selama proses katalisis. Enzim menunjukkan fleksibilitasnya dalam berikatan dengan substrat (Stryer *et al.*, 2002).



Gambar 2.7. Interaksi Substrat dan Enzim Model *Induced Fit* (Stryer *et al.*, 2002).

Struktur protein enzim dapat mempengaruhi aktivitas katalitik. Aktivitas katalitik enzim akan hilang bila terjadi denaturasi protein. Denaturasi protein adalah perubahan struktur protein yang menyebabkan hilangnya fungsi alamiah protein. Akibat yang ditimbulkan dari suatu denaturasi adalah hilangnya sifat biologis dan protein itu. Protein dapat terdenaturasi oleh panas, pH yang ekstrim, garam anorganik dengan konsentrasi tinggi, pelarut organik seperti alkohol atau aseton, dapat juga terdenaturasi oleh urea atau detergen (Nelson dan Michael, 2003).

Ditinjau dari tempat terbentuknya dan tempat kerjanya, enzim juga dapat dibedakan menjadi enzim ekstraseluler dan intraseluler. Enzim intraseluler adalah enzim yang terletak di dalam sel, setelah diperoleh biakan sel maka dilakukan pemecahan membran sel untuk mengeluarkan enzim. Untuk mengekstraksi enzim, kultur mikroba disentrifugasi, dan supernatannya merupakan ekstrak kasar enzim. Enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang terletak di luar sel, enzim ini selama proses biosintesis menembus membran dan keluar dari sel mikroba. Untuk mendapatkan enzim ini tidak perlu dilakukan pemecahan membran sel (Lehninger, 1997).

2.3.3 Spesifikasi enzim

Substrat harus mempunyai hubungan tertentu terhadap bentuk dan sifat kimia sisi aktif enzim untuk bisa terjadi ikatan. Enzim bersifat spesifik terhadap suatu reaksi. Menurut Price dan Lewis (2006), kekhususan enzim terhadap reaksi dapat bersifat :

1. Kekhususan sterik dimana golongan enzim bekerja berdasarkan stereokimia struktur molekul dari substratnya. Dari dua senyawa yang enansiomer, enzim hanya bereaksi dengan salah satunya.
2. Kekhususan reaksi dimana terdapat dua golongan enzim yang bekerja berdasarkan substrat-substrat yang memiliki gugus fungsional sejenis yang bekerja berdasarkan jenis reaksinya yaitu:
 - a. Kekhususan relatif, apabila suatu enzim bekerja terhadap substrat yang memiliki gugus fungsional sejenis.
 - b. Kekhususan absolut, apabila suatu enzim bekerja terhadap satu substrat saja.

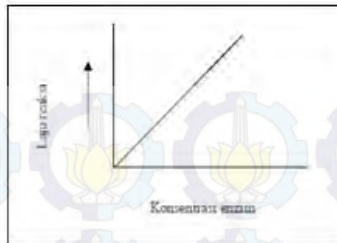
(Price dan Lewis, 2006).

2.3.4 Aktivitas enzim

Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, temperatur dan pH.

1. Konsentrasi enzim

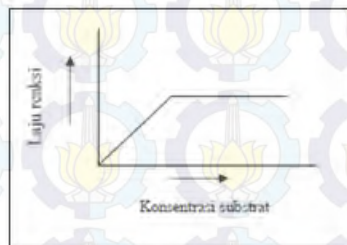
Kecepatan reaksi enzimatik dipengaruhi oleh konsentrasi enzim. Banyaknya substrat yang diubah menjadi produk adalah sebanding dengan tingginya konsentrasi enzim yang digunakan (Gambar 2.8). Semakin tinggi konsentrasi enzim maka laju reaksi berjalan lebih cepat selama konsentrasi enzim jauh lebih sedikit dibanding substrat (Stryer *et al.*, 2002).



Gambar 2.8 Kurva Pengaruh Konsentrasi Enzim Terhadap Laju Reaksi (Stryer *et al.*, 2002).

2. Konsentrasi substrat

Konsentrasi substrat mempengaruhi kecepatan reaksi suatu enzim. Konsentrasi substrat yang tinggi dapat mempercepat laju reaksi, tetapi jika konsentrasi substrat diperbesar maka tidak ada lagi penambahan laju reaksi (Gambar 2.9). Hal ini terjadi dikarenakan enzim telah jenuh dengan substrat. Pada konsentrasi substrat yang menghasilkan laju reaksi maksimal, penambahan konsentrasi substrat lebih lanjut tidak akan merubah laju reaksi (Stryer *et al.*, 2002).

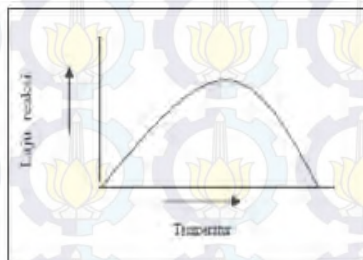


Gambar 2.9 Kurva Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Laju Reaksi (Stryer *et al.*, 2002).

3. Pengaruh temperatur

Temperatur dapat mempengaruhi laju reaksi suatu enzim. Semakin tinggi temperatur maka laju reaksi berjalan makin cepat. Makin tinggi temperatur menyebabkan atom-atom dalam molekul enzim memiliki energi yang lebih besar

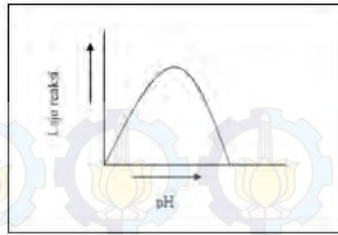
sehingga lebih banyak yang mencapai energi pengaktifan. Namun jika temperaturnya dinaikkan melebihi temperatur optimum maka laju reaksi akan menurun tajam seperti yang ditunjukkan pada (Gambar 2.10) dikarenakan enzim kehilangan aktivitasnya akibat terdenaturasi (Stryer *et al.*, 2002).



Gambar 2.10 Pengaruh Temperatur Terhadap Laju Reaksi (Stryer *et al.*, 2002).

4. Pengaruh pH

Suatu enzim dapat bermuatan positif atau negatif pada pH tertentu. Hal ini dikarenakan enzim dapat bersifat basa, netral, atau asam tergantung rantai samping susunan proteinnya. Pada pH tertentu enzim dapat beraktivitas maksimum (pH optimum). pH optimum tergantung pada masing-masing enzim karena setiap enzim memiliki pH optimum yang spesifik yang juga tergantung pada konsentrasi substrat yang digunakan. Pada kondisi pH semakin menjauhi pH optimumnya maka laju reaksinya menjadi lebih rendah. Kurva yang menunjukkan pH optimum ditunjukkan pada Gambar 2.11 (Stryer *et al.*, 2002).



Gambar 2.11 Kurva Pengaruh pH Terhadap Laju Reaksi (Stryer *et al.*, 2002).

2.3.5 Satuan unit aktivitas enzim

Aktivitas enzim diekspresikan dalam mol substrat yang hilang atau produk yang terbentuk per satuan waktu. *Nomenclature Commission of the International Union of Biochemistry* (1992) merekomendasikan beberapa cara ekspresi aktivitas enzim :

1. International unit / unit enzim / unit / U

1 unit aktivitas adalah sejumlah enzim yang mengkatalisis perubahan 1 μmol substrat atau pembentukan 1 μmol produk dalam satu menit.

2. Aktivitas molekular

Aktivitas molekular merupakan jumlah unit per μmol enzim dimana merupakan jumlah μmol produk yang terbentuk per μmol enzim per menit.

3. Aktivitas pusat katalitik

Aktivitas pusat katalitik adalah jumlah mol substrat yang dikonversi atau produk yang terbentuk oleh sebuah pusat aktif enzim per menit.

4. *Turn over number*

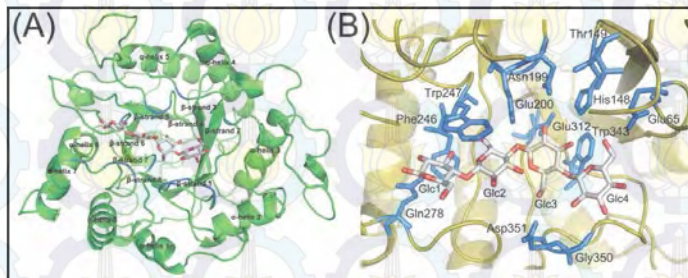
Turn over number adalah μmol produk yang dihasilkan per menit per kadar protein enzim.

2.4 Enzim Selulase

Selulase adalah nama bagi semua enzim yang dapat memutuskan ikatan glikosidik β -1,4 di dalam struktur selulosa, sedodekstrin, selobiosa, dan turunan selulosa lainnya. Selulase

merupakan enzim ekstraseluler. Degradasi selulosa merupakan hasil kerja sekelompok enzim selulolitik. Sistem enzim ini terdiri dari 3 kelompok utama yaitu endoglukanase (endo-1,4- β -D-glukanase, CMCase atau endoselulase), eksoglukanase (ekso-1,4- β -D-glukanase atau *cellobiohydrolase*) dan *cellobiase* (β -glukosidase atau *β -D-glucoside glucohidrolase*).

Enzim selulase memiliki pH optimum antara 4-5 sedangkan pH stabilnya antara 4-6. Enzim ini terhambat oleh adanya produk termasuk cellobiosa. Logam berat seperti Cu^{2+} dan Hg^{2+} juga menghambat aktivitas selulosa (Wiseman, 1975). Struktur enzim selulase ditunjukkan pada Gambar 2.12.



Gambar 2.12. Struktur enzim selulase (Kim *et al.*, 2006).

Keterangan gambar : (A: struktur enzim selulase dan B: sisi aktif enzim).

Terdapat tiga jenis reaksi katalitik dari selulase yaitu : pemecah interaksi nonkovalen dalam struktur kristalin selulosa (endoselulase), hidrolisis serat selulase untuk memecahnya menjadi gula yang lebih kecil (eksoselulase), dan hidrolisis disakarida dan tetrasakarida ke dalam glukosa (β -glukosidase).

Tabel 2.1 Substrat dan Prosedur Untuk Uji Aktivitas (Wood, 1992)

Enzim	Substrat
Total selulase	a. Kapas b. <i>Filter paper, hydrocellulose</i>
Exo-1,4-β-D-glucanase (cellobiohydrolase, exocellulase)	a. <i>Avicel</i> b. <i>Hydrocellulose</i> c. <i>Cellulose amorf</i>
Endo-1,4-β-D-glucanase (endoglucanase, CMC, endocellulase)	a. <i>Carboxymethylcellulose</i> b. <i>Hidroethylcellulose</i> c. Substitusi dan non-substitusi cello-oligosakarida d. Kapas, <i>Cellulose amorf</i>
Cellobiase	a. Cellobiase, p-Nitrofenil- β-D- glukosida b. Cello-oligosakarida

2.4.1 Enzim endoglukanase

Endoglukanase adalah salah satu kompleks selulase yang memiliki kemampuan untuk memecah ikatan 1,4-β-glikosida pada rangkaian selulosa secara acak menghasilkan selulodekstrin/selulo-oligosakarida (Henrissat dan Bairoch, 1996; Miyamoto, 1997). Endoglukanase juga memiliki kemampuan memecah ikatan-ikatan β-glikosida untuk dapat mengganggu struktur kristal dari selulosa sehingga menghasilkan potongan-potongan besar berbentuk rantai dengan ujung-ujung bebas. Berat molekul enzim endoglukanase sebesar 12,5 – 90 kDa (Nevell dan Zeronian, 1985), 52 kDa (Li *et al.*, 1965), 23,5 – 58 kDa (Beldman *et al.*, 1985).

2.4.2 Enzim eksoglukanase

Eksoglukanase adalah salah satu kompleks selulase yang memiliki kemampuan untuk memecah unit glukosil dari kutub non-reduksi pada rangkaian selulosa menghasilkan selobiosa (Henrissat dan Bairoch, 1996; Miyamoto, 1997). Berat molekul

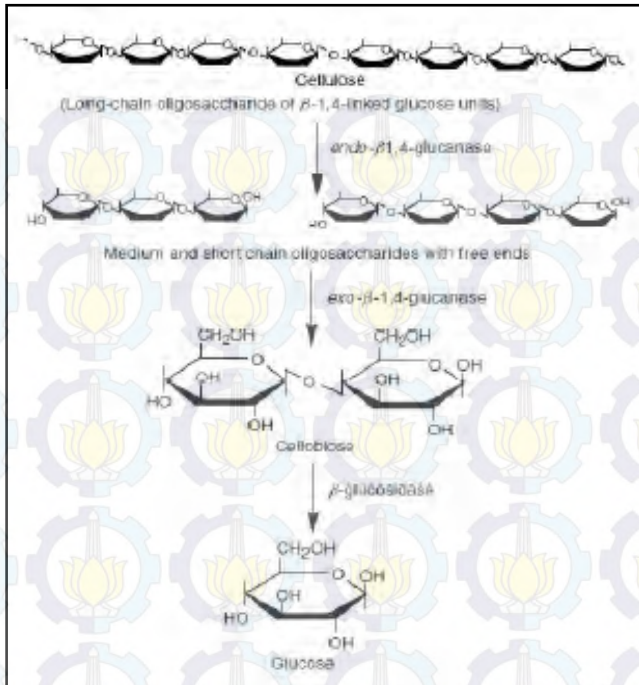
enzim eksoglukanase sebesar 41,8 – 65 kDa (Nevell dan Zeronian, 1985), 60,5 – 62 kDa (Beldman *et al.*, 1985).

2.4.3 Enzim β -glukosidase

Enzim β -glukosidase adalah salah satu kompleks selulase yang memiliki kemampuan untuk memecah unit glukosil dari kutub non-reduksi dari selulooligosakarida (Henrissat dan Bairoch, 1996) dan menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa (Miyamoto, 1997). Berat molekul enzim β -glukosidase sebesar 47; 50; 76; 98; 165; 182 dan 332 kDa (Nevell dan Zeronian, 1985) dan 76 kDa (Beldman *et al.*, 1985).

2.5 Mekanisme Degradasi Selulosa

Enzim endoglukanase menghidrolisis secara acak bagian amorf selulosa melalui pemutusan ikatan I,4- β -glikosidik menghasilkan oligosakarida (selulodekstrin) dengan panjang yang berbeda membentuk ujung rantai baru. Endoglukanase juga memecah ikatan β -glikosida untuk struktur kristal selulosa sehingga menghasilkan potongan besar berbentuk rantai dengan ujung bebas. Enzim eksoglukanase bekerja terhadap ujung non pereduksi selulosa menghasilkan selobiosa. Hidrolisis selulosa secara efektif memerlukan enzim β -glukosidase yang memecah selobiosa menjadi 2 molekul glukosa. Mekanisme hidrolisis glukosa ditunjukkan pada Gambar 2.13.



Gambar 2.13 Mekanisme Hidrolisis Selulosa (Moat *et al.*, 2002).

2.6 Limbah Tongkol jagung

Substrat alam mempunyai kandungan selulosa yang cukup besar sehingga cukup potensial jika digunakan sebagai media pertumbuhan mikroorganisme. Salah satunya adalah limbah tongkol jagung. Jagung adalah salah satu produk pertanian yang banyak dihasilkan di negara Indonesia. Pada tahun 2007 produksi jagung nasional mencapai 13.287.527 ton dan diperkirakan meningkat menjadi 14.854.050 ton pada tahun 2008 (Anonim^a, 2008). Menurut Irawadi (1990) buah jagung terdiri dari 30% limbah yang berupa tongkol jagung. Jika dikonversikan dengan jumlah produksi jagung pada tahun 2008, maka negara Indonesia berpotensi menghasilkan tongkol jagung sebanyak 4.456.215 ton. Jumlah limbah tersebut dapat dikatakan sangat banyak dan akan

menjadi sangat potensial jika dapat dimanfaatkan secara tepat.

Pemanfaatan jagung saat ini sangat beraneka ragam. Salah satunya adalah produksi xilan dari tongkol jagung. Saat proses produksi xilan, bahan yang diekstrak dari tongkol jagung berupa hemiselulosa. Residu yang berupa selulosa umumnya belum dimanfaatkan secara optimal.

Menurut Irawadi (1990) limbah pertanian (termasuk tongkol jagung), mengandung selulosa (41%), hemiselulosa (36%) dan lignin (6%). Komposisi kimia tersebut membuat tongkol jagung dapat digunakan sebagai sumber energi, bahan pakan ternak dan sebagai sumber karbon bagi pertumbuhan mikroorganisme. Karakteristik dan komposisi tongkol jagung dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.2 Karakteristik dan Komponen Tongkol Jagung (Irawadi, 1990)

Kandungan	(%)	Jumlah Nutrisi	(%)
Air	9,4	Protein	2,5
Selulosa	41	Lemak, ester, dll	0,5
Hemiselulosa	36	Serat kasar	32
Xilan	30	Abu	1,5
Lignin	6	Ekstrak nitrogen bebas	53,5
Pektin	3	Neutral detergen fiber	83
Pati	0.014	Total nutrien dapat dicerna	42

2.7 Pretreatment

Proses *pretreatment* pada bahan lignoselulosa dilakukan untuk mempermudah proses hidrolisis yaitu membuka struktur lignoselulosa agar selulosa menjadi lebih mudah diakses oleh enzim yang memecah polimer polisakarida menjadi bentuk monomer, sehingga dapat mengurangi penggunaan enzim dan dapat menekan biaya (Dashtban dkk, 2009). Proses perlakuan awal dilakukan karena beberapa faktor seperti kandungan lignin, ukuran partikel serta kemampuan hidrolisis dari selulosa dan hemiselulosa (Hendriks dan Zeeman, 2009).

Berbagai sumber bahan lignoselulosa perlu dilakukan proses perlakuan awal lebih dahulu untuk mempermudah proses hidrolisis. Proses ini merupakan cara penting untuk proses konversi selulosa yang dapat dilakukan dengan berbagai metoda yaitu secara kimia, fsika maupun biologi. Selain itu juga untuk memisahkan selulosa dari ikatan lignin-hemiselulosa dan mengurangi kristal selulosa (Balan dkk, 2009). Metode perlakuan awal dibedakan berdasarkan proses dengan mekanik, perlakuan asam, perlakuan alkali dan perlakuan dengan menggunakan larutan organik (Tabel 2.2).

Tabel 2.3 *Pretreatment* Bahan Lignoselulosa (Saha, 2003)

Perlakuan	Contoh
Mekanik	Digerus, digiling, digunting
Perlakuan asam	Asam sulfat dan asam klorida encer, asam sulfat dan asam klorida pekat
Perlakuan alkali	Sodium hidroksida, amonia, alkali hidrogen peroksida
Perlakuan larutan organik	Metanol, etanol, butanol, phenol

Metode perlakuan awal secara fisik meliputi penggilingan, pemanasan dengan uap bertekanan, panas kering dan iradiasi. Penggilingan dapat merusak struktur kristal, menurunkan derajat polimerisasi dan peningkatan densitas kamba dari selulosa. Perlakuan pemanasan dengan uap bertekanan akan mengakibatkan lapisan lignin menjadi lunak sehingga mudah dipisahkan dari selulosa (Knap dan Howell, 1980).

Ukuran partikel mempengaruhi laju hidrolisis enzim, sehingga proses *pretreatment* dengan mekanik perlu dilakukan, berdasarkan penelitian Widjaja (2009), menyebutkan bahwa perubahan diameter partikel jerami dari 80 – 100 mesh ke 120-140 mesh meningkatkan produksi enzim. Hal ini karena ukuran partikel jerami makin kecil, makin besar luas permukaan kontak

antara enzim dengan jerami. *Pretreatment* secara kimiawi juga dilakukan oleh Widjaja (2009) yaitu delignifikasi menggunakan NaOH 2%, hasil produksi yang diperoleh lebih tinggi dari pada yang tidak menggunakan delignifikasi NaOH. Hal ini juga sesuai dengan Vega (1991), yang menyebutkan bahwa *pretreatment* dengan NaOH dapat menghilangkan residu, sehingga mempermudah diakses oleh selulosa. Metode perlakuan awal kimia dengan penggunaan larutan NaOH, karena dapat menyebabkan pelonggaran diameter pori-pori selulosa, penurunan derajat kristalisasi dan polimerisasi, serta penghancuran struktur lignin (Knap dan Howell, 1980).

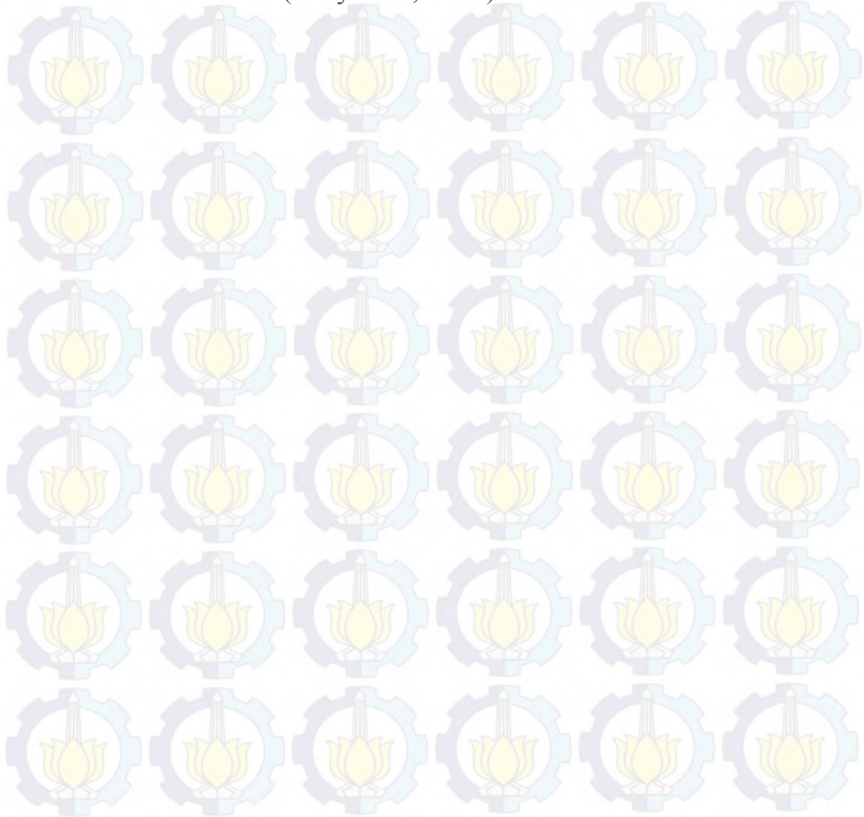
2.8 Fermentasi Media Padat

Sistem fermentasi padat umumnya diidentikkan dengan pertumbuhan mikroorganisme dalam partikel pada substrat dalam berbagai variasi kadar air. Substrat padat bertindak sebagai sumber karbon, nitrogen, mineral, dan faktor-faktor penunjang pertumbuhan, dan memiliki kemampuan untuk menyerap air, untuk pertumbuhan mikroba (Tanyildizi, 2007).

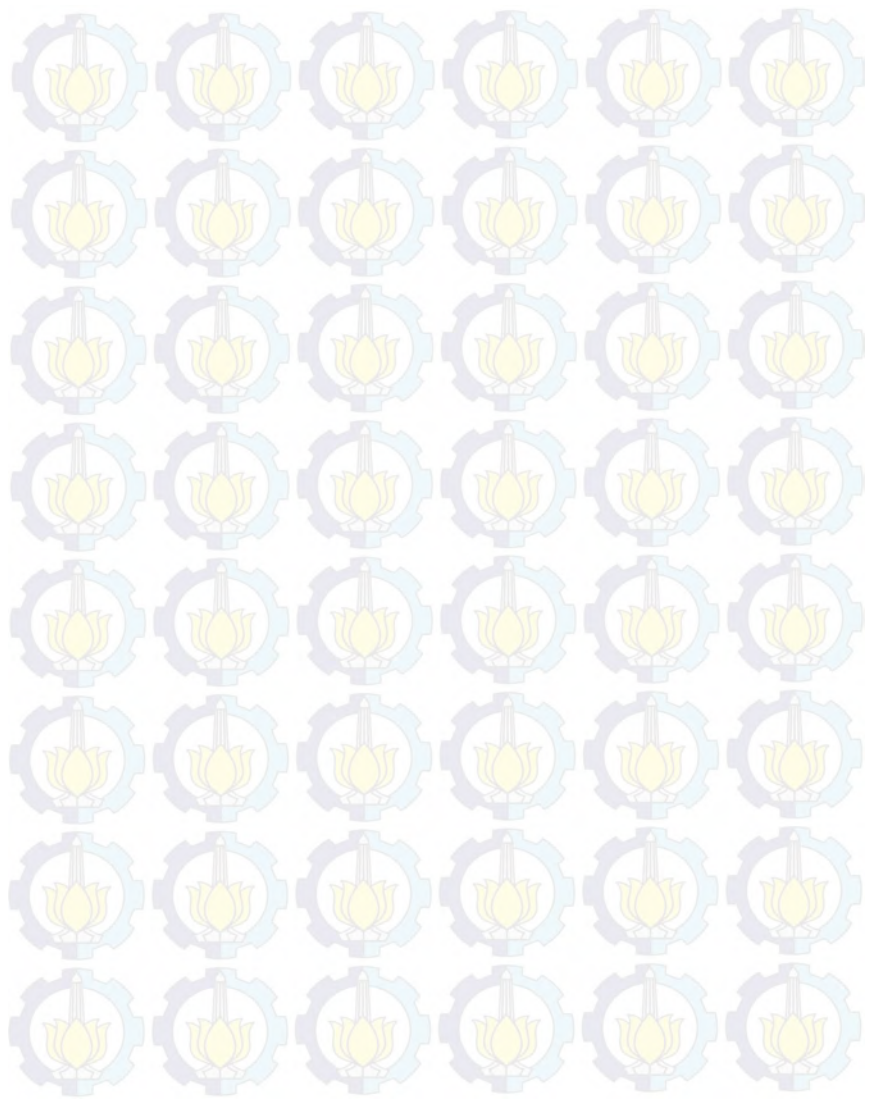
Mikroorganisme yang tumbuh melalui sistem fermentasi padat berada pada kondisi pertumbuhan di bawah habitat alaminya, mikroorganisme tersebut dapat menghasilkan enzim dan metabolisme yang lebih efisien dibandingkan dengan sistem fermentasi cair. Sistem fermentasi padat memiliki lebih banyak manfaat dibandingkan dengan sistem fermentasi cair, diantaranya tingkat produktivitasnya tinggi, tekniknya sederhana, biaya investasi rendah, kebutuhan energi rendah, jumlah air yang dibuang sedikit, recovery produknya lebih baik, dan busa yang terbentuk sedikit. Sistem fermentasi padat ini dilaporkan lebih cocok digunakan di negara-negara berkembang. Manfaat lain dari sistem fermentasi padat adalah murah dan substratnya mudah didapat, seperti produk pertanian dan industri makanan (Tanyildizi, 2007).

Enzim yang dihasilkan melalui proses sistem fermentasi padat baik yang belum dimurnikan atau yang dimurnikan secara

parsial dapat diaplikasikan di industri (seperti pectinase digunakan untuk klarifikasi jus buah, alpha amylase untuk sakarifikasi pati). Murahnya harga residu pertanian dan agro-industri merupakan salah satu sumber yang kaya akan energi yang dapat digunakan sebagai substrat dalam sistem fermentasi padat. Fakta menunjukkan bahwa residu ini merupakan salah satu reservoir campuran karbon terbaik yang ada di alam. Dalam sistem fermentasi padat, substrat padat tidak hanya menyediakan nutrisi bagi kultur tetapi juga sebagai tempat penyimpanan air untuk sel mikroba (Tanyildizi, 2007).



“Halaman ini sengaja dikosongkan”



BAB III METODOLOGI

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikologi, Botani, Mikrobiologi dan Bioteknologi Biologi ITS. Waktu penelitian ini dimulai pada bulan Januari sampai dengan Juli 2014.

3.2 Alat, Bahan dan Cara Kerja

3.2.1 Isolat kapang

Isolat kapang *Penicillium* sp. di dapatkan dari koleksi kultur murni Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Biologi ITS yang diisolasi dari kawasan pesisir Wonorejo Surabaya.

3.2.2 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kentang, agar-agar batangan, dextrosa, limbah tongkol jagung, NaOH 2%, air panas, medium dasar pertumbuhan yang terdiri dari 2 g KH_2PO_4 ; 0,34 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0016 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,005 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0014 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,002 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dan 1,4 g *yeast ekstrak*. Larutan DNS, dan larutan CMC 1%, larutan ekstrak tween 80 0,1 %, larutan substrat avicel 1%, larutan buffer sitrat 0,05 M pH 4,8, kertas saring Whatman No.1, larutan buffer fosfat 0,02 pH 6,5 alkohol, kertas saring, aluminium foil, dan aquades.

3.2.3 Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoclave, wadah plastik, mesin penggiling, saringan, labu ukur, erlenmeyer, oven, labu filter, inkubator, vorteks, *water bath*, termometer, spektrofotometer UV-Vis, tabung reaksi, kain sumbat, batang pengaduk, korek api, spatula, mikroskop listrik,

pipet mikro, lemari es, jarum tanam tajam, timbangan analitik, pH meter, *Haemocytometer*, dan alat-alat gelas yang biasa dipakai di laboratorium.

3.3 Prosedur Kerja

3.3.1 Pembuatan larutan

a. Larutan DNS

Larutkan 1,4 g NaOH dalam 20 ml aquades lalu ditambahkan 0,7 g DNS dan diaduk hingga homogen menggunakan stirrer. Di lain tempat, larutkan 21,6 g ga ram Rochelle (Na-K tartrat), 0,5 ml fenol dan 0,6 g s odium metabisulfit (Na-metabisulfit) dalam 50 ml aquades. Campurkan kedua larutan tersebut hingga volumenya mencapai 100 ml (Ghose, 1987).

b. Larutan NaOH 2%

Larutan NaOH disiapkan dengan cara menimbang 20 g NaOH, dilarutkan dengan aquades hingga volumenya mencapai 1000 ml (Aminah, 2011).

c. Larutan substrat carboxymethyl cellulose 1%

Sebanyak 1 g carboxymethyl cellulose dilarutkan dalam 100 ml buffer sitrat pH 4,8 (Aminah, 2011).

d. Larutan substrat avicel 1%

Sebanyak 1 g avicel dilarutkan dalam 100 ml buffer sitrat pH 4,8, kemudian disterilkan dengan autoclave.

e. Larutan tween 80 0,1%

Masukkan 1 ml tween 80 ke dalam erlenmeyer, lalu ditambahkan aquades hingga volumenya mencapai 100 ml dan aduk hingga homogen (Alfiah, 2012).

3.3.2 Pembuatan medium

a. Medium padat PDA

Kentang sebanyak 200 g dikupas kemudian diiris dadu. Irisan kentang tersebut direbus dalam 1000 ml aquades sampai kentang menjadi lunak. Air rebusan kentang disaring dalam gelas beaker sehingga diperoleh suspensi bening, kemudian endapannya dibuang. Suspensi bening diencerkan dengan aquades hingga volume akhir 1000 ml. Kemudian ditambahkan dextrose dan agar batangan masing-masing 1,5 g. Campuran bahan dipanaskan di atas kompor listrik hingga semua bahan terlarut sempurna. Medium dituang ke dalam tabung reaksi yang telah steril, masing-masing 6 ml. Mulut tabung ditutup dengan kapas steril, lalu diautoclave pada tekanan 1,5 atm dengan temperatur 121°C selama 15-20 menit (Aminah, 2011).

b. Medium dasar pertumbuhan

Medium yang digunakan terdiri dari larutan garam mineral dan ekstrak yeast sebagai sumber nitrogen organik untuk meningkatkan produksi enzim. Komposisi media dasar ini dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Komposisi Medium Dasar Pertumbuhan (Fauzan, 2009)

Zat	Komposisi g/L aquades	Zat	Komposisi g/L aquades
<i>Yeast Ekstrak</i>	1,4	MnSO ₄ .H ₂ O	0,0016
KH ₂ PO ₄	2	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,005
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,34	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0014
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,002

Bahan-bahan tersebut dilarutkan dengan aquades hingga volume akhir 1000 ml dalam erlenmeyer. Erlenmeyer kemudian ditutup dengan kapas yang telah dibungkus kasa dan ditutup dengan aluminium foil.

Proses sterilisasi dilakukan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15-20 menit dengan tekanan 1,5 atm (Fauzan, 2009).

3.3.3 Persiapan substrat alam

Substrat yang digunakan adalah tongkol jagung, dimana substrat diberi perlakuan sebelum digunakan sebagai medium. Pada pembuatan substrat tongkol jagung ini, terdapat dua macam perlakuan. Substrat pertama, dibuat dari tongkol jagung hanya melalui tahap *treatment* substrat secara mekanik saja. Tanpa melalui proses kimiawi. Sedangkan substrat yang kedua melalui proses *treatment* substrat secara mekanik maupun secara kimiawi. Tahap *treatment* substrat dapat dibagi menjadi 2 tahap yaitu :

- Tahap *treatment* substrat secara mekanik;
Substrat dikeringkan di bawah sinar matahari selama 4 hari. Substrat dipotong ukuran ± 5 mm, dan digiling dengan mesin penggiling (Anwar, 2010). Dioven pada suhu 100°C selama 2 jam (Widjaja, 2010). Substrat disaring dan diambil yang berukuran 120-140 mesh (Anwar, 2010; Vega, 1991; Widjaja, 2010).
- Tahap *treatment* substrat secara kimiawi;
Substrat ditambah 100 ml NaOH 2% dalam erlenmeyer, dipanaskan pada suhu 85°C selama 6 jam (Anwar, 2010; Reddi dan Narasimha, 2011). Lalu substrat dipisah dengan kertas saring. Padatan substrat yang telah terpisah dibilas dengan air panas pada suhu 70°C - 80°C hingga pH larutan menjadi 7. Padatan substrat dioven pada suhu 100°C selama 3 jam, lalu didinginkan pada suhu kamar (Patradhiani, 2010; Wijdaja, 2010; Sun dan Cheng, 2002; Sanchez dan Cardona, 2008).

3.3.4 Peremajaan kapang

Medium padat yang telah disterilkan digunakan untuk meremajakan kapang. Proses peremajaan kapang dilakukan pada suhu kamar. Disiapkan bunsen, isolat kapang *Penicillium* sp. dari koleksi kultur murni Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Biologi ITS, jarum tanam tajam dan alkohol. Medium PDA agar miring yang steril diinokulasi isolat kapang secara aseptis. Kemudian biakan diinkubasi pada suhu ruang

selama 7 hari. Biakan *Penicillium* sp. dibuat menjadi 2 subkultur yaitu kultur stok dan kultur kerja. Untuk kultur stok, disimpan dalam lemari pendingin dan diremajakan kembali tiap sebulan sekali (Jayant, 2011).

3.3.5 Preparasi starter *Penicillium* sp.

Kultur kapang yang berusia 7 hari pada medium miring PDA disuspensikan dengan menambahkan 10 ml aquades steril ke dalamnya. Dilakukan pelepasan spora menggunakan jarum inokulasi. Kemudian tabung divortex untuk memisahkan gumpalan spora dan untuk mendapatkan suspensi yang homogen. Jumlah spora dihitung dengan *Haemocytometer* untuk mendapatkan 10^6 spora/ml yang akan digunakan sebagai inokulum (Yusriah, 2013).

Suspensi spora yang telah didapatkan kemudian diinokulasikan ke dalam erlenmeyer yang mengandung 12,5 ml medium dasar pertumbuhan dan 2,5 g substrat tongkol jagung yang telah disterilisasi. Banyaknya suspensi spora yang diinokulasikan yakni 10% dari total media pertumbuhan yang digunakan, dengan ketentuan setiap ml suspensi mengandung 10^6 spora. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang sampai misellium penuh. Metode ini diadaptasi dari metode fermentasi padat oleh Widjaja (2009).

3.3.6 Optimasi enzim selulase pada medium tongkol jagung

Tahapan ini dilakukan dengan menyiapkan 25 ml medium pertumbuhan ditambah dengan 5 g substrat tongkol jagung (Widjaja, 2009). Medium diatur pada pH 6 (Alfiah, 2012). Kemudian disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Selanjutnya *Penicillium* sp. diinokulasikan ke dalam medium tersebut (Liu, 2007), lalu diinkubasi selama 20 hari. Konsentrasi inokulum yang digunakan adalah 10%, 15%, 20% dari total medium yang digunakan dengan variasi lama fermentasi adalah 4, 8, 12, 16 dan 20 hari.

3.3.7 Ekstraksi enzim kasar

Proses pengambilan enzim dimulai dengan mengekstrak hasil fermentasi dengan cara menambahkan 20 ml larutan pengeksrak tween 80 0,1% ke dalam kultur yang telah diinkubasi (Widjaja, 2009) sehingga diperoleh filtrat dan padatan. Kemudian filtrat dan padatan dipisahkan dengan menggunakan centrifuge dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit (Sa'adah, 2010; Charita, 2012). Filtrat yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar enzim yang digunakan untuk mengetahui aktivitas enzim.

3.3.8 Pembuatan kurva standar glukosa

Glukosa anhidrat ditimbang sebanyak 0-2 mg dalam masing-masing tabung reaksi dengan variasi 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 dan 2 mg/ml, kemudian masing-masing ditambahkan 1 ml buffer sitrat. Disiapkan tabung reaksi bersih dengan jumlah yang sama, masing-masing diisi dengan 0,5 ml larutan standar glukosa dengan blanko dibuat dari aquades sebanyak 1 ml. Ditambahkan 3 ml DNS ke dalam masing-masing tabung (termasuk blanko), kemudian dipanaskan dalam penangas air selama 5 menit. lalu didinginkan dengan air es dan diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 540 nm (Ghose, 1987).

3.3.9 Uji aktivitas enzim selulase

a. Uji aktivitas enzim endoglukanase

Pada umumnya endoglukanase bekerja pada selulosa amorf (larut) atau pada selulosa yang mempunyai kristalin rendah seperti CMC (Gong dan Tsao, 1979; Anindyawati, 2009). Wood (1992) juga menyebutkan bahwa selain substrat CMC juga dapat digunakan substrat hidroethylcellulose, substitusi dan non-substitusi cello-oligosakarida, kapas, dan cellulose amorf.

Pengukuran aktivitas endoglukanase ditentukan berdasarkan metode DNS (Miller, 1959), dengan menentukan jumlah gula pereduksi yang terbentuk. Gula pereduksi yang terbentuk berhubungan dengan aktivitas enzim. Dimana semakin tinggi aktivitas enzim, maka semakin banyak pula gula pereduksi

yang dihasilkan. Hal ini berarti semakin tinggi nilai absorbansi yang terukur pada spektrofotometer. Aktivitas enzim endoglukanase dapat menggunakan substrat CMC 2% dalam 0,05 M buffer sitrat pH 4,8 (Ghose, 1987).

Tahap pertama adalah sebanyak 1 ml supernatan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 ml substrat CMC 1% dalam 0,05 M buffer sitrat pH 4,8, setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam. Setelah inkubasi, ditambahkan 1 ml DNS, kemudian dipanaskan pada air mendidih selama 15 menit dan didinginkan kembali dengan es. Sedangkan untuk kontrol dilakukan dengan perlakuan yang sama yakni dengan mencampurkan 1 ml supernatan dengan 1 ml DNS tanpa inkubasi. Terakhir ditambahkan 1 ml substrat CMC 1%, lalu dipanaskan pada air mendidih selama 15 menit dan didinginkan kembali dengan es. Setelah cukup dingin, dilakukan pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm (Ghose, 1987; Hidayat, 2005).

Selanjutnya nilai absorbansi dikonversikan dengan kurva standar glukosa, sehingga akan diperoleh nilai konsentrasi gula pereduksinya (µg/ml) yang digunakan untuk menghitung aktivitas enzim (U/ml) dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Aktivitas enzim endoglukanase (U/ml)} = \frac{[\text{gula pereduksi}] \times V_1 \times 10^3 \text{ } \mu\text{mol}}{\text{BM} \times V_2 \times T}$$

Keterangan :

BM : berat molekul glukosa

V₁ : volume larutan (ml)

V₂ : volume enzim (ml)

T : masa inkubasi (menit)

Satu unit aktivitas enzim endoglukanase didefinisikan sebagai 1 µmol glukosa yang dilepaskan per menit (Hidayat, 2005).

b. Uji aktivitas enzim eksoglukanase

Enzim eksoglukanase atau yang biasanya disebut dengan enzim selobiohidrolase menunjukkan aktivitas yang tinggi pada selulosa kristal tetapi rendah pada selulosa amorf (Gong dan Tsao, 1979; Anindyawati, 2009). Aktivitas enzim eksoglukanase atau selobiohidrolase seringkali diuji dengan substrat avicel sehingga enzim eksoglukanase disebut dengan aviselase (Zhang *et al.*, 2006). Wood (1992) juga menyebutkan bahwa terdapat tiga jenis substrat yang dapat dipakai untuk uji aktivitas enzim ini, yakni avicel, hydrocellulose dan cellulose amorf.

Uji aktivitas enzim eksoglukanase menggunakan substrat avicel dilakukan dengan cara menambahkan 1 ml supernatan dan 1 ml substrat avicel dalam buffer fosfat 0,2 M pH 6,5 (Nur dkk., 2008).

Sebanyak 1 ml supernatan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 ml substrat avicel 1% dalam buffer fosfat 0,2 M pH 6,5. Setelah itu diinkubasi pada suhu 50°C selama 1 jam. Setelah inkubasi, ditambahkan 1 ml DNS, kemudian dipanaskan pada air mendidih selama 15 menit dan didinginkan kembali dengan es. Sedangkan untuk kontrol dilakukan dengan perlakuan yang sama yakni dengan mencampurkan 1 ml supernatan dengan 1 ml DNS tanpa inkubasi. Terakhir ditambahkan 1 ml substrat avicel 1%, lalu dipanaskan pada air mendidih selama 15 menit dan didinginkan kembali dengan es. Setelah cukup dingin, dilakukan pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm (Hidayat, 2005; Nur dkk., 2008).

Selanjutnya nilai absorbansi dikonversikan dengan kurva standar glukosa, sehingga akan diperoleh nilai konsentrasi gula pereduksinya ($\mu\text{g/ml}$) yang digunakan untuk menghitung aktivitas enzim (U/ml) dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Aktivitas enzim eksoglukanase (U/ml)} = \frac{[\text{gula pereduksi}] \times V_1 \times 10^3}{\text{BM} \times V_2 \times T} \mu\text{mol}$$

Keterangan :

BM : berat molekul glukosa

V_1 : volume larutan (ml)

V_2 : volume enzim (ml)

T : masa inkubasi (menit)

Satu unit aktivitas enzim eksoglukanase didefinisikan sebagai 1 μmol glukosa yang dilepaskan per menit (Hidayat, 2005).

c. Uji aktivitas enzim filter paperase (Fp-ase)

Pengukuran aktivitas enzim Fp-ase menggunakan metode Ghose (1987), yakni menggunakan kertas saring Whatman no.1 dengan ukuran 1x6 cm (50 mg). Kertas saring dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 1 ml 0,05 M buffer sitrat pH 4,8 dan 0,5 ml supernatan. Kemudian diinkubasi dalam *water bath* pada suhu 50°C selama 60 menit. Sedangkan kadar gula pereduksi terlarut diukur dengan menambahkan 3 ml larutan DNS, lalu dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit dan didinginkan kembali dengan es (Ghose, 1987). Untuk kontrol diperlakukan dengan perlakuan yang sama, namun tanpa inkubasi. Tahap selanjutnya adalah pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Selanjutnya nilai absorbansi dikonversikan dengan kurva standar glukosa. Aktivitas enzim Fp-ase dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Aktivitas enzim Fp - ase (U/ml)} = \frac{[\text{gula pereduksi}] \times V_1 \times 10^3 \mu\text{mol}}{\text{BM} \times V_2 \times T}$$

Keterangan :

BM : berat molekul glukosa

V_1 : volume larutan (ml)

V_2 : volume enzim (ml)

T : masa inkubasi (menit)

Satu unit aktivitas enzim fp-ase didefinisikan sebagai 1 μmol glukosa yang dilepaskan per menit (Hidayat, 2005).

3.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan 2 faktor, yakni masa inkubasi dan konsentrasi inokulum dengan 2 kali ulangan.

Tabel 3.2 Aktivitas Enzim Selulase (IU/ml) Pada Substrat Pertama (Substrat Tongkol Jagung dengan *Treatment* Mekanik)

Masa inkubasi	Konsentrasi inokulum	Enzim selulase					
		K ₁		K ₂		K ₃	
		1	2	1	2	1	2
H ₁	E ₁	H ₁ E ₁ K ₁	H ₁ E ₁ K ₁	H ₁ E ₁ K ₂	H ₁ E ₁ K ₂	H ₁ E ₁ K ₃	H ₁ E ₁ K ₃
	E ₂	H ₁ E ₂ K ₁	H ₁ E ₂ K ₁	H ₁ E ₂ K ₂	H ₁ E ₂ K ₂	H ₁ E ₂ K ₃	H ₁ E ₂ K ₃
	E ₃	H ₁ E ₃ K ₁	H ₁ E ₃ K ₁	H ₁ E ₃ K ₂	H ₁ E ₃ K ₂	H ₁ E ₃ K ₃	H ₁ E ₃ K ₃
H ₂	E ₁	H ₂ E ₁ K ₁	H ₂ E ₁ K ₁	H ₂ E ₁ K ₂	H ₂ E ₁ K ₂	H ₂ E ₁ K ₃	H ₂ E ₁ K ₃
	E ₂	H ₂ E ₂ K ₁	H ₂ E ₂ K ₁	H ₂ E ₂ K ₂	H ₂ E ₂ K ₂	H ₂ E ₂ K ₃	H ₂ E ₂ K ₃
	E ₃	H ₂ E ₃ K ₁	H ₂ E ₃ K ₁	H ₂ E ₃ K ₂	H ₂ E ₃ K ₂	H ₂ E ₃ K ₃	H ₂ E ₃ K ₃
H ₃	E ₁	H ₃ E ₁ K ₁	H ₃ E ₁ K ₁	H ₃ E ₁ K ₂	H ₃ E ₁ K ₂	H ₃ E ₁ K ₃	H ₃ E ₁ K ₃
	E ₂	H ₃ E ₂ K ₁	H ₃ E ₂ K ₁	H ₃ E ₂ K ₂	H ₃ E ₂ K ₂	H ₃ E ₂ K ₃	H ₃ E ₂ K ₃
	E ₃	H ₃ E ₃ K ₁	H ₃ E ₃ K ₁	H ₃ E ₃ K ₂	H ₃ E ₃ K ₂	H ₃ E ₃ K ₃	H ₃ E ₃ K ₃
H ₄	E ₁	H ₄ E ₁ K ₁	H ₄ E ₁ K ₁	H ₄ E ₁ K ₂	H ₄ E ₁ K ₂	H ₄ E ₁ K ₃	H ₄ E ₁ K ₃
	E ₂	H ₄ E ₂ K ₁	H ₄ E ₂ K ₁	H ₄ E ₂ K ₂	H ₄ E ₂ K ₂	H ₄ E ₂ K ₃	H ₄ E ₂ K ₃
	E ₃	H ₄ E ₃ K ₁	H ₄ E ₃ K ₁	H ₄ E ₃ K ₂	H ₄ E ₃ K ₂	H ₄ E ₃ K ₃	H ₄ E ₃ K ₃
H ₅	E ₁	H ₅ E ₁ K ₁	H ₅ E ₁ K ₁	H ₅ E ₁ K ₂	H ₅ E ₁ K ₂	H ₅ E ₁ K ₃	H ₅ E ₁ K ₃
	E ₂	H ₅ E ₂ K ₁	H ₅ E ₂ K ₁	H ₅ E ₂ K ₂	H ₅ E ₂ K ₂	H ₅ E ₂ K ₃	H ₅ E ₂ K ₃
	E ₃	H ₅ E ₃ K ₁	H ₅ E ₃ K ₁	H ₅ E ₃ K ₂	H ₅ E ₃ K ₂	H ₅ E ₃ K ₃	H ₅ E ₃ K ₃

Keterangan :

H₁ = masa inkubasi 4 hari

H₂ = masa inkubasi 8 hari

H₃ = masa inkubasi 12 hari

H₄ = masa inkubasi 16 hari

H₅ = masa inkubasi 20 hari

E₁ = enzim endoglukanase

E₂ = enzim eksoglukanase

E₃ = enzim Fp-ase

K₁ = konsentrasi inokulum 10%

K₂ = konsentrasi inokulum 15%

K₃ = konsentrasi inokulum 20%

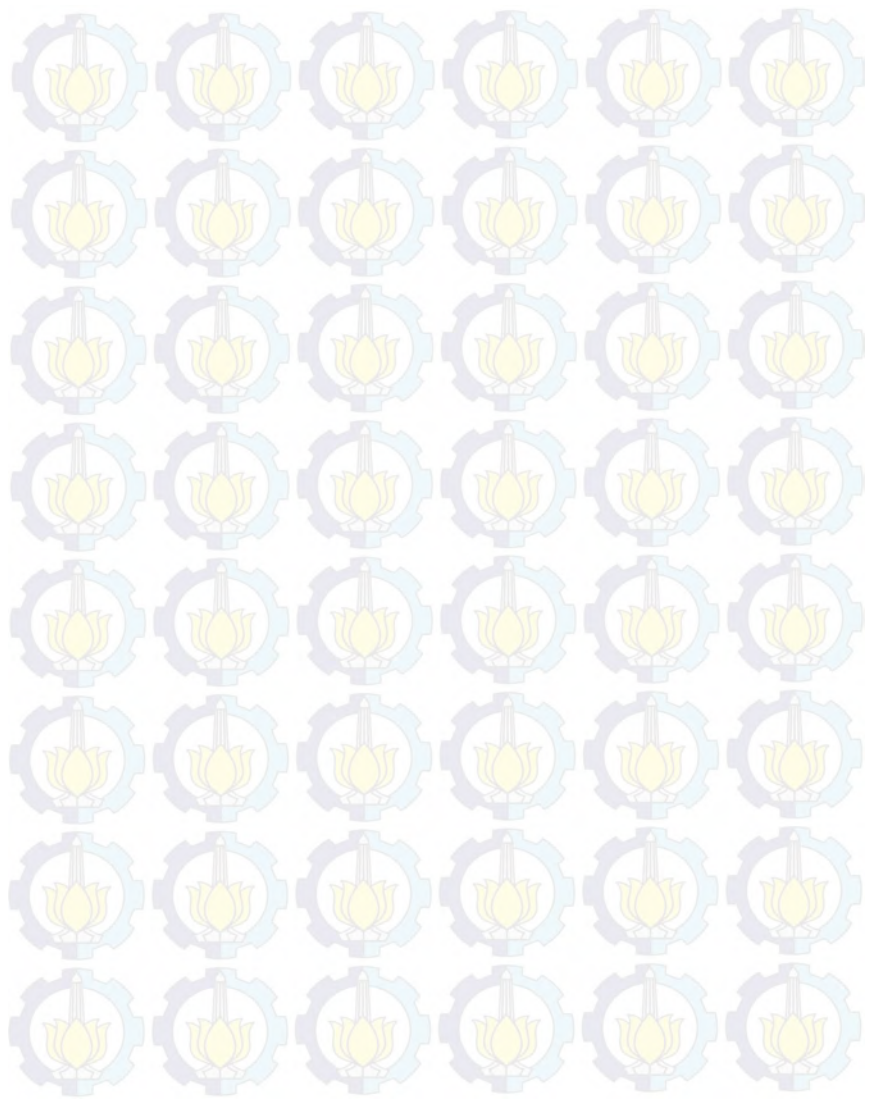
Tabel 3.3 Aktivitas Enzim Selulase (IU/ml) Pada Substrat Kedua (Substrat Tongkol Jagung dengan *Treatment* Mekanik dan Kimiawi)

Masa inkubasi	Konsentrasi inokulum	Enzim selulase					
		K ₁		K ₂		K ₃	
		1	2	1	2	1	2
H ₁	E ₁	H ₁ E ₁ K ₁	H ₁ E ₁ K ₁	H ₁ E ₁ K ₂	H ₁ E ₁ K ₂	H ₁ E ₁ K ₃	H ₁ E ₁ K ₃
	E ₂	H ₁ E ₂ K ₁	H ₁ E ₂ K ₁	H ₁ E ₂ K ₂	H ₁ E ₂ K ₂	H ₁ E ₂ K ₃	H ₁ E ₂ K ₃
	E ₃	H ₁ E ₃ K ₁	H ₁ E ₃ K ₁	H ₁ E ₃ K ₂	H ₁ E ₃ K ₂	H ₁ E ₃ K ₃	H ₁ E ₃ K ₃
H ₂	E ₁	H ₂ E ₁ K ₁	H ₂ E ₁ K ₁	H ₂ E ₁ K ₂	H ₂ E ₁ K ₂	H ₂ E ₁ K ₃	H ₂ E ₁ K ₃
	E ₂	H ₂ E ₂ K ₁	H ₂ E ₂ K ₁	H ₂ E ₂ K ₂	H ₂ E ₂ K ₂	H ₂ E ₂ K ₃	H ₂ E ₂ K ₃
	E ₃	H ₂ E ₃ K ₁	H ₂ E ₃ K ₁	H ₂ E ₃ K ₂	H ₂ E ₃ K ₂	H ₂ E ₃ K ₃	H ₂ E ₃ K ₃
H ₃	E ₁	H ₃ E ₁ K ₁	H ₃ E ₁ K ₁	H ₃ E ₁ K ₂	H ₃ E ₁ K ₂	H ₃ E ₁ K ₃	H ₃ E ₁ K ₃
	E ₂	H ₃ E ₂ K ₁	H ₃ E ₂ K ₁	H ₃ E ₂ K ₂	H ₃ E ₂ K ₂	H ₃ E ₂ K ₃	H ₃ E ₂ K ₃
	E ₃	H ₃ E ₃ K ₁	H ₃ E ₃ K ₁	H ₃ E ₃ K ₂	H ₃ E ₃ K ₂	H ₃ E ₃ K ₃	H ₃ E ₃ K ₃
H ₄	E ₁	H ₄ E ₁ K ₁	H ₄ E ₁ K ₁	H ₄ E ₁ K ₂	H ₄ E ₁ K ₂	H ₄ E ₁ K ₃	H ₄ E ₁ K ₃
	E ₂	H ₄ E ₂ K ₁	H ₄ E ₂ K ₁	H ₄ E ₂ K ₂	H ₄ E ₂ K ₂	H ₄ E ₂ K ₃	H ₄ E ₂ K ₃
	E ₃	H ₄ E ₃ K ₁	H ₄ E ₃ K ₁	H ₄ E ₃ K ₂	H ₄ E ₃ K ₂	H ₄ E ₃ K ₃	H ₄ E ₃ K ₃
H ₅	E ₁	H ₅ E ₁ K ₁	H ₅ E ₁ K ₁	H ₅ E ₁ K ₂	H ₅ E ₁ K ₂	H ₅ E ₁ K ₃	H ₅ E ₁ K ₃
	E ₂	H ₅ E ₂ K ₁	H ₅ E ₂ K ₁	H ₅ E ₂ K ₂	H ₅ E ₂ K ₂	H ₅ E ₂ K ₃	H ₅ E ₂ K ₃
	E ₃	H ₅ E ₃ K ₁	H ₅ E ₃ K ₁	H ₅ E ₃ K ₂	H ₅ E ₃ K ₂	H ₅ E ₃ K ₃	H ₅ E ₃ K ₃

3.5 Analisa Data

Data penelitian ini dianalisa dengan menggunakan metode deskriptif kuantitatif. Uji aktivitas enzim dilakukan untuk melihat pengaruh perlakuan terhadap aktivitas enzim selulase pada variasi lama inkubasi dan konsentrasi inokulum yang berbeda.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kapang Penghasil Selulase

Penelitian ini dimulai dengan peremajaan isolat kapang penghasil selulase yang sebelumnya telah dilakukan isolasi dan identifikasi isolat kapang dari tanah kawasan Wonorejo, Surabaya oleh Kuswytasari *et al.*, (2011). Peremajaan isolat dimulai dengan menginokulasikan kapang ke dalam media PDA agar miring dengan temperatur ruangan selama 7 hari hingga terbentuk spora. Medium PDA merupakan medium semi sintetik yang mengandung kebutuhan pokok penunjang pertumbuhan semua mikroorganisme.

Hampir semua medium dapat digunakan untuk menumbuhkan miselium jamur. Umumnya miselium jamur tumbuh dalam medium yang mengandung karbohidrat tinggi dengan pH 5 sampai 6. Setiap jenis jamur mempunyai persyaratan hara yang khas. Oleh karena itu, tidak mungkin dalam satu jenis medium dapat ditumbuhkan semua jenis miselium jamur. Selain karbohidrat, medium untuk menumbuhkan miselium jamur harus mengandung sumber nitrogen, fosfor, kalium, sulfur, vitamin dan mineral.



Gambar 4.1 Isolat Murni dari Kapang *Penicillium* sp 2.

Setelah 7 hari tumbuh dalam medium agar miring, kapang dipindahkan ke dalam medium dasar pertumbuhan yang terdiri dari larutan garam mineral dan nitrogen untuk meningkatkan produksi enzim, seperti magnesium, sulfur, kalium, fosfor, mangan, zinc dan lain sebagainya. Medium yang digunakan pada penelitian ini juga mengandung yeast ekstrak yang berfungsi sebagai sumber nitrogen dan glukosa, yang merupakan sumber karbon sederhana yang dapat diabsorpsi langsung oleh sel dan digunakan dalam pembentukan biomassa dimana dalam pembentukan biomassa ini diperlukan sumber karbon seperti mono dan disakarida.

4.2 Persiapan Substrat Alam

Substrat alam yang digunakan dalam penelitian ini adalah tongkol jagung yang digunakan dua jenis perlakuan, yakni substrat dengan *treatment* mekanik maupun kimiawi. Metode *treatment* pada bahan lignoselulosa dilakukan untuk mempermudah proses hidrolisis yaitu membuka struktur lignoselulosa agar selulosa menjadi lebih mudah diakses oleh enzim dari polisakarida menjadi monosakarida (Hendriks dan Zeeman, 2009). Pada penelitian ini digunakan dua jenis mekanisme *treatment* pada medium, hal ini dikarenakan untuk mengetahui pengaruh jenis perlakuan pada medium tongkol jagung terhadap aktivitas enzim selulase. Medium dengan perlakuan manakah yang menghasilkan enzim selulase yang paling optimum.

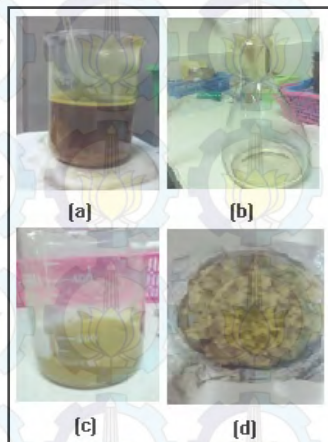
Berbagai sumber bahan lignoselulosa perlu dilakukan proses perlakuan awal lebih dahulu untuk mempermudah proses hidrolisis. Proses ini merupakan cara penting untuk proses konversi selulosa yang dapat dilakukan dengan berbagai metode yaitu secara kimia, fisika maupun biologi.

Selain itu juga untuk memisahkan selulosa dari ikatan lignin-hemiselulosa dan mengurangi kristal selulosa (Balandck, 2009).

Treatment fisik atau mekanik adalah dengan mengeringkan substrat di bawah sinar matahari, dipotong, dioven, maupun digiling. Penggilingan dapat merusak struktur kristal,

menurunkan derajat polimerisasi dan peningkatan densitas kamba dari selulosa. Perlakuan pemanasan dengan uap bertekanan akan mengakibatkan lapisan lignin menjadi lunak sehingga mudah dipisahkan dari selulosa (Knap dan Howell, 1980).

Dalam penanganan substrat limbah tongkol jagung ini diperlukan waktu yang cukup lama, yakni sekitar 1 minggu agar kadar air benar-benar berkurang. Sehingga menghindarkan tumbuhnya organisme lain yang tidak diharapkan. Sedangkan untuk *treatment* kimiawi, substrat dapat dipanaskan bersamaan dengan larutan NaOH 2% selama 6 jam (Anwar, 2010; ReddidanNarasimha, 2011). Hal ini juga sesuai dengan Knap dan Howell (1980), bahwa penggunaan larutan NaOH menyebabkan pelonggaran diameter pori-pori selulosa, penurunan derajat kristalisasi dan polimerisasi, serta penghancuran struktur lignin.



Gambar 4.2 *Treatment* Substrat dengan NaOH 2%.

Keterangan gambar : (a: pemanasan substrat dengan NaOH 2%; b: penyaringan substrat menggunakan corong Buchner; c: substrat dengan pH netral; d: substrat siap dikeringkan).

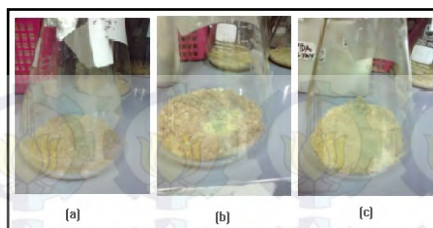
Substrat limbah yang ditreatment NaOH mempunyai pH 14 yang kemudian diturunkan menjadi pH 7 dengan cara membilasnya menggunakan air panas dan dilakukan penyaringan

secara berulang. Agar tidak banyak medium yang terbang karena partikelnya yang kecil, penyaringan dapat dibantu dengan corong Buchner yang diletakkan pada leher erlenmeyer Buchner dan selang yang tersambung dengan pompa vakum (Gambar 4.2b), sehingga penyaringan akan lebih cepat dan tidak ada medium yang ikut terbang bersama air hasil saringan. Selanjutnya medium dioven pada suhu 60°C selama 48 jam pada loyang terbuka (Gambar 4.2d).

4.3 Preparasi Starter *Penicillium* sp. dan Optimasi Enzim Selulase

Tahap selanjutnya adalah pembuatan starter dari inokulum kapang *Penicillium* sp. Sebelumnya, kapang yang berusia 7 hari pada medium agar miring PDA disuspensikan dengan penambahan ± 10 ml aquades steril ke dalamnya menggunakan jarum inokulasi secara aseptis. Setelah itu tabung divorteks supaya homogen, lalu dihitung jumlah sporanya dengan *Haemocytometer* menggunakan mikroskop. Jumlah minimal sel hidup dalam inokulum adalah 10^6 .

Komposisi medium yang digunakan untuk starter adalah 2,5 gr substrat tongkol jagung dan 12,5 ml medium pertumbuhan dengan kondisi kelembaban yang cukup. Starter ini sebagai proses penyesuaian kapang dengan medium dan lingkungan yang baru. Menurut Widjaja (2009), jumlah suspensi spora yang diinokulasikan adalah 10% dari total medium. Perkembangan starter kapang pada substrat limbah pertanian cukup membutuhkan waktu yang panjang. Pada hari ketiga, belum terdapat perkembangan hifa yang merata pada permukaan medium starter. Bahkan, ada pula yang belum terlihat pertumbuhannya secara kasat mata. Namun pada hari ke12-13, hifa telah memenuhi permukaan medium (Gambar 4.3).



Gambar 4.3 Pertumbuhan Starter Kapang *Penicillium* sp.

Keterangan gambar: (a: starter hari ke-1; b: starter hari ke-3; c: starter hari ke-13).

Pada tahap optimasi enzim selulase digunakan komposisi bahan dan medium yang sama, namun yang membedakan adalah konsentrasinya, yakni digunakan 5 gr substrat tongkol jagung dan 25 ml medium pertumbuhan. pH medium diatur menjadi 6 dari pH 7 dengan cara penambahan HCl dan dikondisikan pada suhu 35°C, karena aktivitas selulase optimum pada kondisi pH dan suhu ini (Alfiah, 2012). Pada tahap optimasi, waktu yang digunakan totalnya adalah 20 hari dengan jarak waktu 4; 8; 12; 16 dan 20 hari. Hal ini dikarenakan mengacu pada usia starter kapang itu sendiri. Perkembangan hifa membutuhkan waktu yang lebih lama untuk menembus dan memenuhi mediumnya, yakni 13 hari. Sedangkan produksi enzim terdapat pada fase logaritmik (eksponensial). Ekstraksi enzim dilakukan dengan penambahan larutan tween 80 0,1% masing-masing sebanyak 20 ml pada setiap perlakuan. Penambahan larutan tween ini berfungsi untuk melepas hifa konidiospora dan membuat suspensi menjadi homogen.

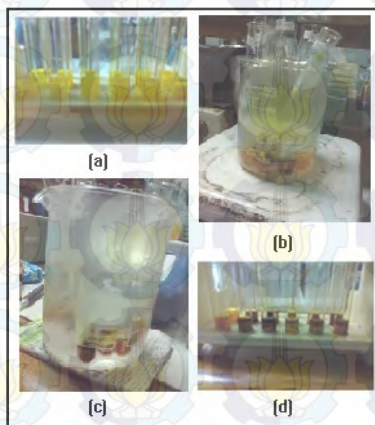
4.4 Pengaruh Lama Inkubasi dan Konsentrasi Inokulum Terhadap Aktivitas Enzim Selulase

Enzim selulase merupakan enzim ekstraseluler yang diekskresikan kapang pada media produksinya. Pada penelitian ini dilakukan pengujian pada jenis enzim selulase, yakni enzim endoglukanase, eksoglukanase dan total selulase (Fp-ase).

Uji aktivitas endoglukanase menggunakan substrat CMC.

CMC merupakan jenis substrat untuk uji aktivitas enzim endo-1,4- β -D-glukanase (Wood, 1992). Enzim endoglukanase akan mendegradasi CMC menjadi selulodekstrin yang merupakan gula pereduksi dengan menghidrolisis ikatan glikosidik β -1,4 secara acak, sehingga membentuk rantai yang terbuka untuk aktivitas enzim eksoglukanase. Enzim eksoglukanase bekerja menghidrolisis selulosa kristal (avicel), selulodekstrin (produk enzim endoglukanase) menghasilkan produk utama selobiosa. Pada uji aktivitas enzim *filter paperase* digunakan substrat kertas filter Whatman no.1 (Ghose, 1987).

Pereaksi DNS sering digunakan untuk menguji aktivitas enzim selulase secara umum karena semua gula pereduksi yang dihasilkan dapat diukur menggunakan DNS.



Gambar 4.4 Reaksi DNS dengan Gula Pereduksi.

Keterangan: (a: sebelum dipanaskan; b: saat pemanasan; c: pendinginan dengan es; d: setelah didinginkan).

DNS ditambahkan untuk mengoksidasi gula pereduksi yang dihasilkan pada proses degradasi masing-masing substrat. Dimana gula pereduksi ini akan mereduksi asam 3,5-dinitrosalisilat (warna kuning tua) menjadi asam 3-amino-5-nitrosalisilat (berwarna coklat).

Penambahan sulfit pada DNS dilakukan untuk

menanggulangi kelarutan oksigen yang dapat mengoksidasi gula pereduksi, sedangkan penambahan fenol berfungsi untuk menstabilkan warna (Rahmansyah, 2003). Pemanasan dalam air mendidih bertujuan untuk menyempurnakan reaksi dengan DNS sedangkan es berfungsi untuk menghentikan reaksi.

Pengukuran aktivitas enzim selulase didasarkan pada variasi lama inkubasi dan konsentrasi inokulum dengan jenis medium tongkol jagung yang berbeda. Medium pertama yakni medium tongkol jagung dengan *treatment* mekanik dan kimiawi. Sedangkan jenis medium kedua adalah medium tongkol jagung dengan *treatment* mekanik saja.

Tabel 4.1 Aktivitas Enzim Selulase Terhadap Beberapa Masa Inkubasi dan Konsentrasi Inokulum Pada Medium Pertama

Masa inkubasi	Konsentrasi starter	Aktivitas endoglukanase (U/ml)	Aktivitas eksoglukanase (U/ml)	Aktivitas Fp-ase (U/ml)
4 hari	10%	0,5059	11,3525	0
	15%	3,4904	9,5304	1,08133
	20%	2,1064	8,2638	0
8 hari	10%	0,9143	0	0,5059
	15%	1,8435	0	27,4305
	20%	0	0	42,2619
12 hari	10%	0	0	9,7916
	15%	0	0	9,4345
	20%	0	0	2,2123
16 hari	10%	1,5773	0	0
	15%	1,6980	0	14,8710
	20%	0,0496	0	35,7738
20 hari	10%	0	0,2314	0
	15%	0,5092	0	0
	20%	0	0,2678	0

Keterangan : angka 0 menunjukkan aktivitas tidak dapat dihitung.

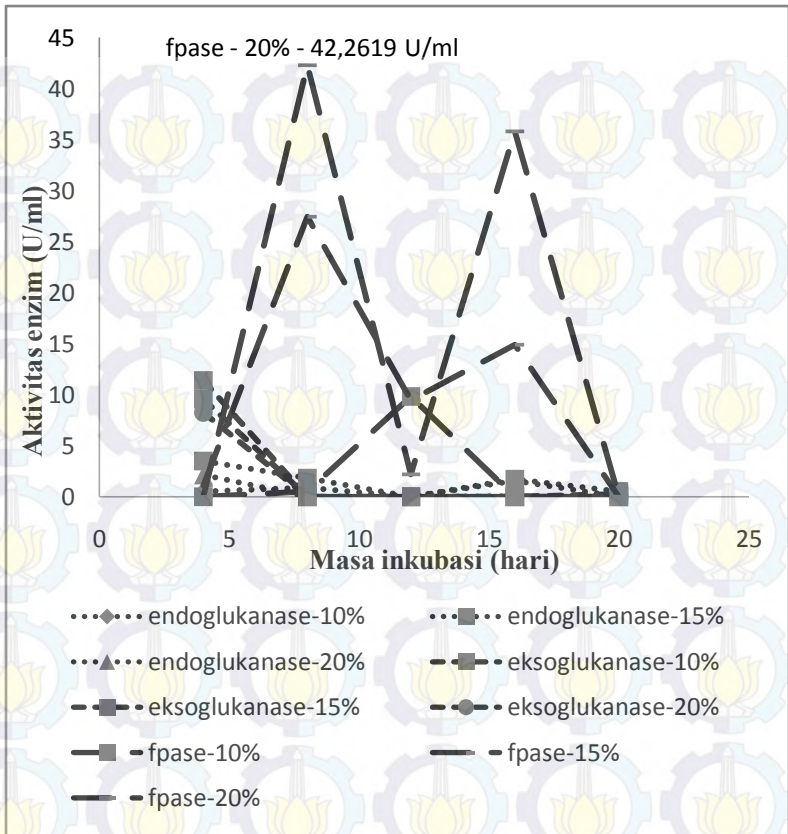
Tabel 4.2 Aktivitas Enzim Selulase Terhadap Beberapa Masa Inkubasi dan Konsentrasi Inokulum Pada Medium Kedua

Masa inkubasi	Konsentrasi starter	Aktivitas endoglukanase (U/ml)	Aktivitas eksoglukanase (U/ml)	Aktivitas Fp-ase (U/ml)
4 hari	10%	0,8779	10,9528	0
	15%	7,4140	11,1408	0
	20%	7,5892	10,1455	0,3373
8 hari	10%	0	0	0
	15%	3,4871	0	0
	20%	6,8601	0	32,1031
12 hari	10%	3,0935	0	13,8194
	15%	1,8105	0	9,8809
	20%	7,0271	0	19,3650
16 hari	10%	0,8796	0	0
	15%	7,7066	0	11,2599
	20%	5,3009	0	34,9702
20 hari	10%	6,0234	4,5072	23,8293
	15%	6,9444	1,3955	10,8730
	20%	6,9113	0,5555	6,2003

Keterangan : angka 0 menunjukkan aktivitas tidak dapat dihitung.

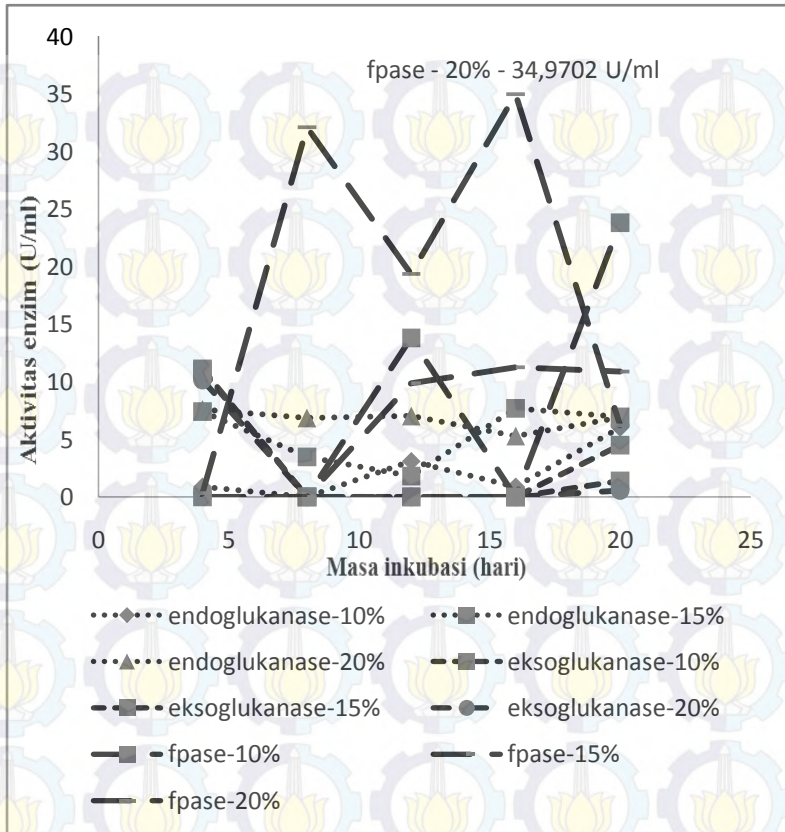
Angka 0 menunjukkan aktivitas yang tidak dapat dihitung, dikarenakan hasil dari selisih nilai absorbansi gula pereduksi yang bernilai negatif. Dimana nilai absorbansi pada ekstrak enzim tanpa inkubasi lebih besar daripada absorbansi ekstrak enzim dengan inkubasi.

Produksi enzim selulase oleh mikroorganisme sangat dipengaruhi oleh dosis inokulum dan lama inkubasi, menurut Marlida *et al* (2002) dalam Hutari (2010), besar kecilnya dosis inokulum akan mempengaruhi massa log phase kapang dalam memproduksi enzim selulase, sedangkan lama inkubasi sangat mempengaruhi jumlah enzim yang dihasilkan.



Gambar 4.5 Grafik Aktivitas Enzim Selulase Pada Medium Pertama.

Berdasarkan Gambar 4.5, diperoleh bahwa pada medium pertama, aktivitas enzim yang paling optimum adalah aktivitas enzim Fp-ase dengan konsentrasi 20% pada masa inkubasi hari ke 8 sebesar 42,269 U/ml. Diikuti dengan aktivitas eksoglukanase yakni 11,3525 U/ml pada konsentrasi 10% dan aktivitas enzim endoglukanase sebesar 3,4904 U/ml pada konsentrasi inokulum 15% dengan masa inkubasi hari ke 4.



Gambar 4.6 Grafik Aktivitas Enzim Selulase Pada Medium Kedua.

Sedangkan pada medium kedua, aktivitas Fp-ase adalah yang tertinggi, yakni pada konsentrasi 20% dengan masa inkubasi hari ke16 sebesar 34,9702 U/ml. Diikuti dengan aktivitas enzim eksoglukanase 11,1408 U/ml yang optimum pada konsentrasi 15% dengan masa inkubasi hari ke 4 dan aktivitas enzim endoglukanase sebesar 7,7066 U/ml dengan konsentrasi inokulum 15% pada masa inkubasi hari ke 16 (Gambar 4.6).

Baik pada jenis medium pertama maupun pada medium kedua, aktivitas yang tertinggi sama-sama pada aktivitas enzim Fp-ase atau total aktivitas selulase. Dimana satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai 1 μ mol glukosa yang terbentuk selama satu menit pada pH 6 dan temperatur 35°C. Namun aktivitas pada medium pertama, lebih besar daripada pada medium kedua. Perbedaan nilai aktivitas ini dikarenakan adanya perbedaan pada mekanisme *treatment* yang dilakukan pada medium tongkol jagung. Medium pertama merupakan medium yang dilakukan dengan *treatment* kimiawi dan mekanik. Sedangkan medium kedua hanya dengan *treatment* mekanik saja. Medium dengan *treatment* mekanik dan kimiawi menghasilkan aktivitas yang lebih besar dikarenakan penggunaan larutan NaOH yang menyebabkan pelonggaran diameter pori-pori selulosa, penurunan derajat kristalisasi dan polimerisasi, serta penghancuran struktur lignin.

Lama fase adaptasi pada mikroorganisme tergantung pada komposisi medium, pH, suhu, aerasi, jumlah sel pada inokulum awal dan sifat fisiologis mikroorganisme pada medium sebelumnya. Ketika sel telah menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru, maka sel mulai membelah hingga mencapai populasi yang maksimum menjadi lebih panjang, perkembangan mikroorganisme menjadi lambat akibatnya biomassa sel yang terbentuk tidak maksimum dalam waktu singkat dan produksi enzim selulase menjadi terhambat. Jika jumlah inokulum lebih besar, maka akan terjadi kompetisi untuk mendapatkan nutrisi didalam proses fermentasi akibatnya biomassa yang terbentuk tidak maksimum sehingga produksi selulase menjadi berkurang (Septiningrum dkk., 2011).

Jumlah inokulum yang tidak sebanding dengan jumlah substrat, hal ini mendorong kapang masuk ke dalam fase stasioner (laju pertumbuhannya sama dengan laju kematiannya). Nahas (1988) menyebutkan bahwa aktivitas enzim akan menurun pada saat kapang memasuki fase stasioner. Hal ini membuktikan bahwa konsentrasi inokulum merupakan faktor yang paling

penting untuk pertumbuhan sel dan pembentukan produksi enzim (Cai *et al.*, 2008).

Proses fermentasi sangat dipengaruhi oleh faktor dosis dan waktu. Tingkat dosis berkaitan dengan besaran populasi mikroorganisme yang berpeluang menentukan cepat tidaknya perkembangan mikroba dalam menghasilkan enzim untuk merombak substrat, sehingga pada gilirannya akan berpengaruh terhadap produk akhir. Pertumbuhan mikroorganisme ditandai dengan lamanya waktu yang digunakan, sehingga konsentrasi metabolik semakin meningkat sampai akhirnya menjadi terbatas yang kemudian dapat menyebabkan laju pertumbuhan menurun (Fardiaz, 1992).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

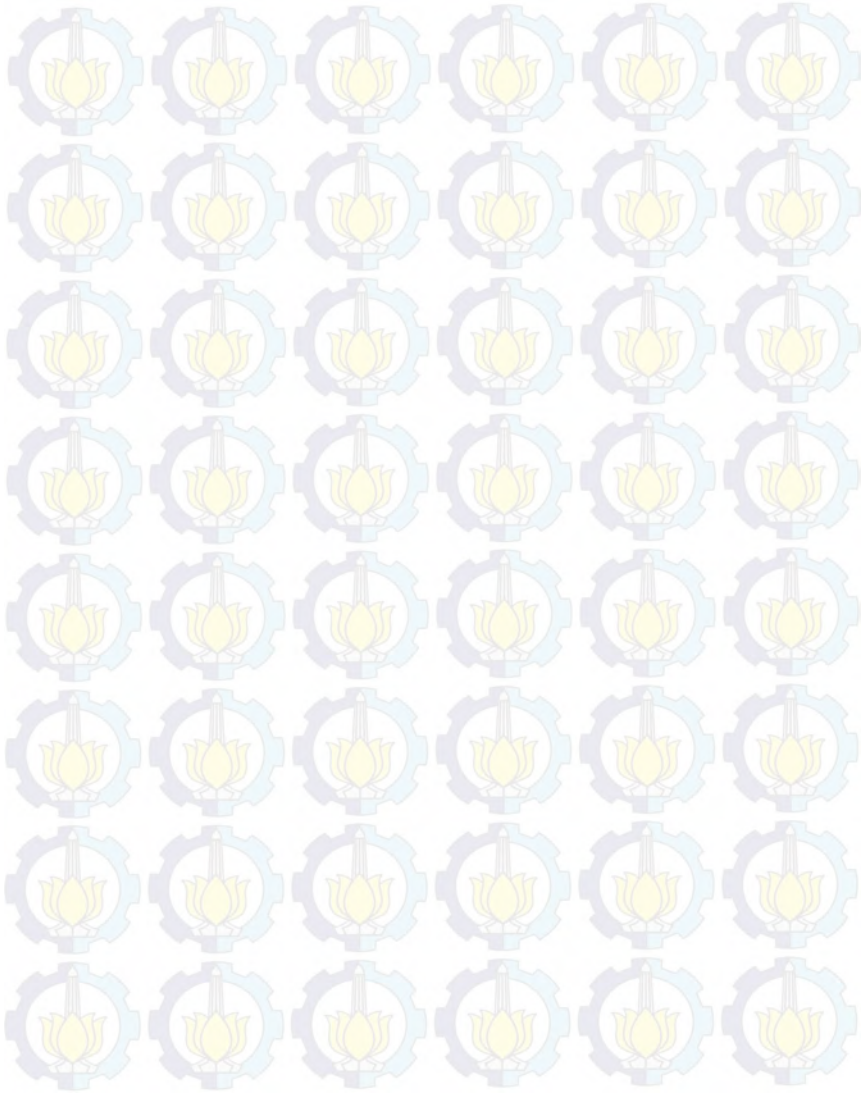
Kesimpulan yang didapatkan dari penelitian ini adalah bahwa pada jenis medium pertama, aktivitas enzim paling optimum adalah pada aktivitas enzim Fp-ase pada konsentrasi inokulum 20% dengan masa inkubasi hari ke 8 sebesar 42,2619 U/ml. Diikuti dengan aktivitas eksoglukanase yakni 11,3525 U/ml pada konsentrasi 10% dan aktivitas enzim endoglukanase sebesar 3,4904 U/ml pada konsentrasi inokulum 15% dengan masa inkubasi hari ke 4.

Sedangkan pada jenis medium kedua, aktivitas Fp-ase adalah yang tertinggi, yakni pada konsentrasi 20% dengan masa inkubasi hari ke 16 sebesar 34,9702 U/ml. Diikuti dengan aktivitas enzim eksoglukanase 11,1408 U/ml yang optimum pada konsentrasi 15% dengan masa inkubasi hari ke 4 dan aktivitas enzim endoglukanase sebesar 7,7066 U/ml dengan konsentrasi inokulum 15% pada masa inkubasi hari ke 16.

5.2 Saran

Variasi konsorsium isolat kapang dari beberapa spesies kapang penghasil selulase pada penelitian ini perlu dikaji dalam kaitannya terhadap peningkatan aktivitas enzim selulase.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”



DAFTAR PUSTAKA

Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., dan Blackwell, M. 1996. **Introductory Mycology**. Fourth Edition. New York: John Wiley & Sons Inc.

Alfiah, I. 2012. Produksi Enzim Selulase Oleh *Penicillium* sp. Pada Suhu, pH dan Limbah Pertanian yang Berbeda. **Tugas Akhir**. Surabaya: Jurusan Biologi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

Aminah, Zaroh. 2011. Isolasi, Karakterisasi dan Uji Spesifitas Substrat Enzim Selulase dari Kapang Tandan Kosong Kelapa Sawit. **Skripsi**. Surabaya: Departemen Kimia, Universitas Airlangga.

Anwar, N., Arief, W., dan Sugeng, W. 2010. Peningkatan Unjuk Kerja Hidrolisis Enzimatik Jerami Padi Menggunakan Campuran Selulase Kasar dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*. **MakaraSains** 14: 114-115.

Astutik, R.P. 2001. Uji Aktivitas Selulase dan Xilanase Isolat Kapang Tanah Wonorejo Surabaya. **Tugas Akhir**. Surabaya: Jurusan Biologi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

Balan, V., B. Bals, S.P.S. Chundawat, D. Marshall, dan B.E. Dale. 2009. Lignocellulose Biomass treatment Using AFEX. **Method in Molecular Biology** 581: 61-77.

Beldman, G., S. Leeuwen, F. Rombouts, dan F. Voragen. 1985. The Cellulase of *Trichoderma viride*, Purification, Characterization and Comparison of all Detectable Endoglucanases, Exoglucanases and Beta-glucosidases. **Eur J. Biochem** : 146-301.

Badan Pusat Statistik. 2013. <<http://www.bps.go.id/>> [6 Oktober 2013].

Cai, C., B. Lou dan X. Zheng. 2008. Keratinase Production and Keratin Degradation by Mutant Strains of *Bacillus subtilis*. **Journal of Zhejiang University Science B**. 9, 60-67.

Camassola, M., dan Aldo, J. P. Dillon. 2009. Biological Pretreatment of Sugar Cane Bagasse for the Production of Celluloses and Xylanases by *Penicillium echinulatum*. **Industrial Crops and Products** 29: 642–647.

Das, A., dan Uma, G. 2009. Solid-State Fermentation of Waste Cabbage by *Penicillium notatum* NCIM NO-923 for Production and Characterization of Cellulases. **Journal of Scientific and Industrial Research** 68: 714-718.

Dashtban, M., Schraft, H., dan Qin, W. 2009. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residue: Opportunities & Perspectives. **Int. J. Biol. Sci**: 578-595.

Desouky, E.M. 2007. Production of Cellulase by *Penicillium hordei* and Pectinase by *Aspergillus ustus* Under Solid State

Fermentation Condition. **N. Egypt Journal Microbiology** 17: 16-17.

Fardiaz, S. 1992. **Biotransformation Inorganic Reaction**. Jakarta: PT. Gramedia Pratama Utama.

Fauzan, A.R. 2009. Kinetika Degradasi Lignin dalam Pulp Bagasse Melalui Degradasi Hemiselulosa oleh Enzim Xilanase dalam Proses Biobleaching. **Tugas Akhir**. Surabaya: Teknik Kimia ITS.

Fowler, M.W. 1988. **Enzyme Technology in Biotechnology for Engineers, Biological System in Technological Processes**. New York: John Wiley & Sons.

Frazier, W.C. dan D.C. Westhoff. 1988. **Food Microbiology**. 4th ed. New York: Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited.

Ghose, T.K. 1987. Measurement of Cellulose Activities. **International Union of Pure and Applied Chemistry** 59: 257-268.

Han, L., J. Feng, C. Zhu dan X. Zhang. 2009. Optiming Cellulase Production of *Penicillium waksmani* F10-2 with Respons Surface Metodology. **Afr. J. Biotechnol** 8: 3879-3886.

Hendriks, A.T.W.M., and G. Zeeman. 2009. Pretreatments to Enhance the Digestibility of Lignocellulose Biomass. **BioresTechnology** 100: 10-18.

Henrissat, B.B dan A. Bairoch. 1996. Updating The Sequence Based Clasification of glycosyl Hydrolases. **J. Biochem** 316: 695-696.

Herliyana, E.N., Dodi, N., Achmad, Lisdar I.S., dan Arif, B.W. 2008. Biodegradasi Substrat Gergajian Kayu Sengon oleh Jamur Kelompok *Pleurotus* Asal Bogor. **J. Tropical Wood Science and Technology** 6: 2.

Hidayat, Iman. 2005. **Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Endo-1,4- β -Glucanase *Bacillus* sp. AR 0 09.** Bogor: Bidang Mikrobiologi LIPI.

Hutari, Meigus. 2010. Pengaruh Dosis Inokulum Kapang *Trichoderma harzianum* dan Lama Fermentasi Campuran Tongkol Jagung dan Blondo Terhadap Aktivitas Enzim Selulase dan Kandungan Protein. **Skripsi.** Padang: Fakultas Peternakan, Universitas Andalas.

Irawadi, T.T. 1991. Produksi Enzim Ekstraseluler (Selulosa dan Xilanase) dari *Neurospora sitophila* pada Substrat Limbah Padat Kelapa Sawit. **Disertasi.** Bogor: Pasca Sarjana, IPB.

Jayant, M., J. Rashmi, M. Shailendradan Y. Deepesh. 2011. Production of Cellulaseby Different Co-Culture of *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum* from Waste Paper, Cotton Waste and Baggase. **Journal Of Yeast And Fungal Research** 2: 2141-2413.

Kuswytasari, N.D., Shovitri, M., dan Andriyadi, R.D. 2011. Soil Mold Diversity in The Coastal Wonorejo Surabaya. **International Conference on Mathematic and Sciences**. Surabaya: ITS Press.

Lehninger, A.L. 1997. **Dasar-dasar Biokimia**. Jilid 1, Penerjemah Maggy Thenawijaya, Jakarta: Penerbit Erlangga.

Liu, Y.T. et al. 2008. Screening, Identifying of Cellulose Decomposing S train L-06 and its Enzyme-Producing Conditions. **Chin. J. Biotech** 24: 1872-2075.

Lynd, L.R., P.J. Weimer, Van Zyl, W.H and I.S. Pretorius. 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamental and Biotechnology. **J. Microbial. Mol. Biol Rev** 66(3).

Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry** 31: 426-428.

Moat, A.G., John W.F, dan Michael, P.S. 2002. **Microbial Physiology**. Fourth Edition. USA: John Wiley & Sons, Inc.

Moore, E. 1996. **Fundamentals of the fungi**. New Jersey: Pentice-Hall.

Nahas, E,J. 1988. Gen. **Mikrobiol**. 134-227.

Nelson, D.L. dan Michael, M.C. 2003. **Principle of Biochemistry**. Fourth Edition.
<http://whfreeman.com/lehninger/>.

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. 1992. **Enzyme Nomenclature**. USA: Academic Press Inc.

Overy, D.P., and K. Karlshøjdan M.J. Due.2005. Low Temperature Growth and Enzyme Production in *Penicillium* Ser. Corymbifera Species, Casual Agents of Blue Mold Storage Rot in Bulbs. **Journal Of Plant Pathology** 87: 57-63.

Patradhiani, Rurry, Utami, I.S., dan Widjaja, A. 2010. Studi Bahan Baku Berlignoselulosa dari Limbah Pertanian untuk Produksi Gula Xilosa Murah Diikuti Proses Fermentasi Menghasilkan Etanol. **Seminar Rekayasa Kimia dan Proses**. UniversitasDiponegoro.

Pelezar, M.J., dan E.C.S. Chan. 2005. **Dasar-dasar Mikrobiologi**. Diterjemahkan oleh Ratna Siri Hadioetomo, Teja, Sutarmi dan Sri Lestari, Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia.

Pratiwi, Feri. M.R. 2006. Produksi Xilanase dari *Streptomyces* sp. Pada Substrat Xilan Tongkol Jagung. **Skripsi**. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, IPB.

Price, N.C dan Lewis, S. 2006. **Fundamental of Enzymology**. England: Oxford University Press.

Pericin. 2008. Valuate of Pumpkin Oil Cake As Substrate for The Cellulase Production by *Penicillium roqueforti* in Solid State Fermentation. **Oumanian Biotechnological Letters** 13: 3815-3820.

Ramli, M., M.Tafsin, dan A.D. Hasjmy. 2009. Pertumbuhan Optimum *Penicillium* spp. dan *Cunninghamella* spp. yang Diisolasi dari Pakan dan Efek Toksiknya pada Mencit (*Mus musculus*). **Media Peternakan**.

Reddi, M. Pradeep, dan Narashimha, G. 2011. Utilization of Pea Seed Husk As Substrate for Cellulase Production by Mutant *Aspergillus niger*. **Insight Biotechnology** 1: 18.

Riyadi, Wahyu. 2008. **Berbagai Larutan Buffer dan Cara Pembuatan**. <<http://wahyuriyadi.blogspot.com/>>. [6 Oktober 2013].

Robinson, T. 1995. **Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi Edisi Keenam**. Diterjemahkan oleh Kosasaih Pandawinata, Bandung: Penerbit ITB.

Sa'adah, Z., I. Noviana dan Abdullah. 2010. Produksi Enzim Selulase Oleh *Aspergillus niger* Menggunakan Substrat Jerami dengan Sistem Fermentasi Padat. **Skripsi**. Semarang: Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik, UNDIP.

Saha, B.C. 2003. Hemicellulose Bioconversion. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol** 30: 279-291.

Samson, R.A., E.S. Hoekstra, dan C.A.N. van Oorschot. 1984. Introduction to food-borne fungi. Netherlands: **Centraalbureauvoor Schimmelcultures**.

Sanchez, O.J., dan Cardona, C.A. 2008. Trends in Biotechnological Production of Fuel Ethanol from Different Feedstocks. **Bioresour. Technol** 99: 5270-5295.

Septiningrum, K., dan Chandra, A.P. Produksi Xilanase dari Tongkol Jagung dengan Sistem Bioproses Menggunakan *Bacillus circulans* untuk Pra-pemutihan Pulp. **Jurnal Riset Industri** Vol. V, No. 1, 2011: Hal 87-97.

Sinaga, Roida.E. 2013. **Karakterisasi Enzim Selulase dan Aplikasinya Pada Substrat Limbah Pertanian**. Institut Pertanian Bogor, Bogor. <<http://share.pdfonline.com/a5debdd4d7e4485e92f1b43d94e90045/Tesis%20Roida%20Sinaga.htm>>. [6 Oktober 2013].

Sindhu, Raveendran, Nair,G.S. dan Shankar, S. Media Engineering for the Production of Cellulase from *Penicillium* Species (SBSS 30) Under Solid State Fermentation. **Research Article, Biotechnol. Bioinf. Bioeng**: 343-349.

Sun, Y., dan Cheng, J. (2002). Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production. **Bioresour. Technol** 83: 1-11.

Stryer, L., Tymoczko, J.L., dan Berg, J.M. 2002. **Biochemistry**. Fifth Edition. New York: WH Freeman.

Tanyildizi, M.S., Dursun Ozer, dan Murat Elibol. 2007. Production of bacterial α -amylase by *B. amyloliquefaciens* Under Solid Substrate Fermentation. **Biochemical Engineering Journal** 37: 294-297.

Treves, David. *Penicillium* sp. <<http://lib.jiangnan.edu.cn>>. [23 Oktober 2012].

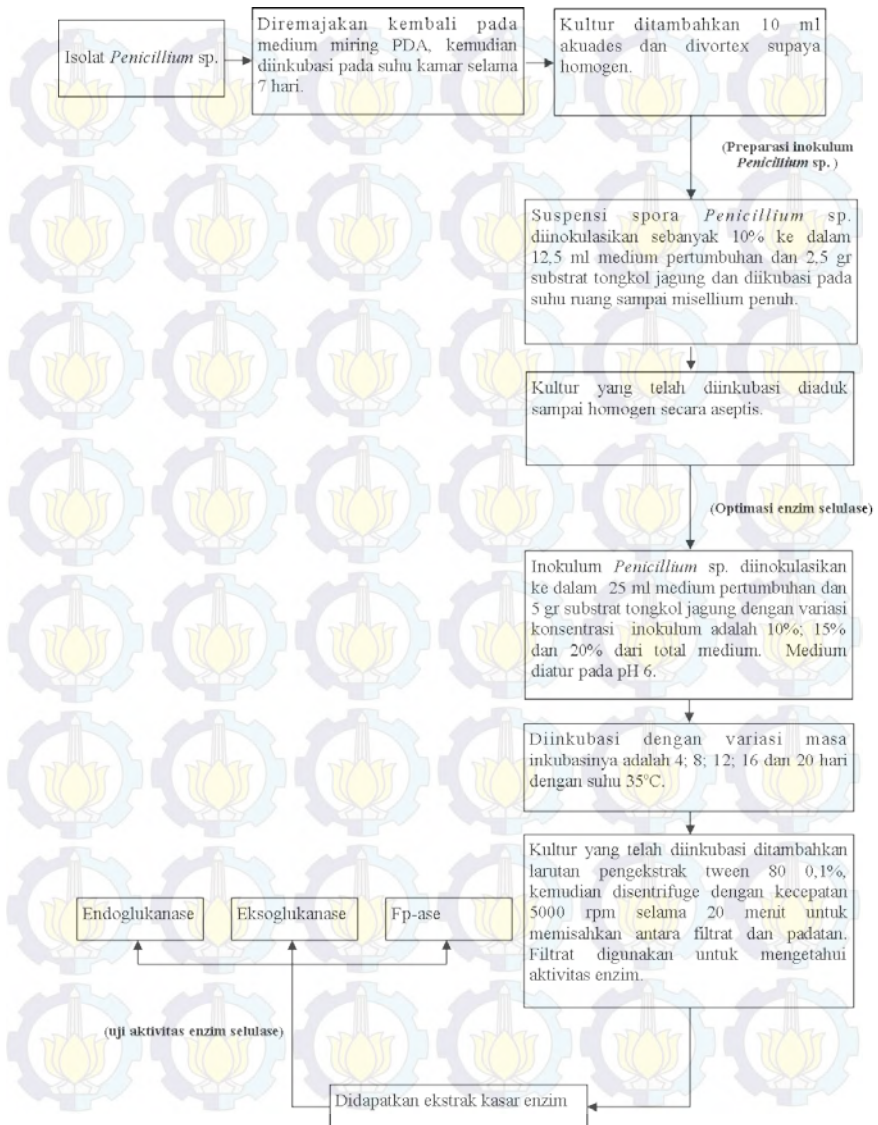
Vega, J. L., K.T. Klasson, E.C. Clausen dan J.L.Gaddy.1991. The Saccharification of Corn Stover by Cellulase from *Penicillium funiculosum*. **Bioresource Technology** 35: 73-80.

Wainwright, M., 1992. **An Introduction to Fungal Biotechnology**. England: John Wiley & Sons Ltd.

Wiseman, A. 1975. **Enzyme Biotechnology**. New York:John Wiley and Sons Inc.

Zhiliang Fan, Lee R. Lynd. 2006. Conversion Of Paper Sludge To Ethanol. **Bioprocess BiosystEng** 30: 35.

Lampiran 1. Diagram Alur Penelitian.



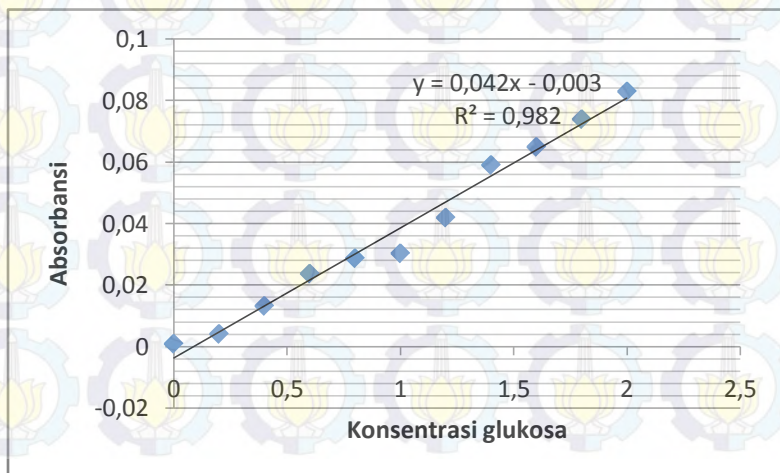
Lampiran 2. Pembuatan Kurva Standar Glukosa.

Kurva standar dibuat dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang 540 nm.

Tabel 1. Hasil pengukuran absorbansi larutan standar glukosa

0	0,001
0,2	0,0042
0,4	0,0133
0,6	0,0238
0,8	0,0288
1	0,0304
1,2	0,042
1,4	0,0591
1,6	0,065
1,8	0,074
2	0,083

Dari tabel diatas, dibuat kurva standar antara absorbansi dengan konsentrasi glukosa.



Lampiran 3. Perhitungan Aktivitas Enzim Endoglukanase.

Dari kurva standar didapat persamaan regresi linear:

$$y = 0,042x - 0,003$$

sehingga contoh perhitungan aktivitas ekstrak kasar enzim selulase adalah :

- Absorbansi produk (gula pereduksi) :

$$0,7335 - 0,5835 = 0,15$$

- Waktu inkubasi : 120 menit

- Berat molekul glukosa : 180

- Konsentrasi produk (gula pereduksi) :

$$y = 0,042x - 0,003$$

$$0,15 = 0,042x - 0,003$$

$$x = 3,6428 \mu\text{g/ml}$$

- Aktivitas enzim : $\frac{[\text{gula pereduksi}] \times V_1 \times 10^3 \mu\text{mol}}{\text{BM} \times V_2 \times T}$

$$= \frac{3,6428 \times 3 \times 10^3 \mu\text{mol}}{180 \times 1 \times 120}$$

$$= 0,5059 \text{ U/ml}$$

Lampiran 4. Perhitungan Aktivitas Enzim Eksoglukanase.

Dari kurva standar didapat persamaan regresi linear:

$$y = 0,042x - 0,003$$

sehingga contoh perhitungan aktivitas ekstrak kasar enzim selulase adalah :

- Absorbansi produk (gula pereduksi) :

$$2,919 - 2,887 = 0,032$$

- Waktu inkubasi : 60 menit

- Berat molekul glukosa : 180

- Konsentrasi produk (gula pereduksi) :

$$y = 0,042x - 0,003$$

$$0,032 = 0,042x - 0,003$$

$$x = 0,8333 \mu\text{g/ml}$$

- Aktivitas enzim : $\frac{[\text{gula pereduksi}] \times V_1 \times 10^3 \mu\text{mol}}{\text{BM} \times V_2 \times T}$

$$= \frac{0,8333 \times 3 \times 10^3 \mu\text{mol}}{180 \times 1 \times 60}$$

$$= 0,2314 \text{ U/ml}$$

Lampiran 5. Perhitungan Aktivitas Enzim Fp-ase.

Dari kurva standar didapat persamaan regresi linear:

$$y = 0,042x - 0,003$$

sehingga contoh perhitungan aktivitas ekstrak kasar enzim selulase adalah :

- Absorbansi produk (gula pereduksi) :
0,8455 - 0,794 = 0,0515
- Waktu inkubasi : 60 menit
- Berat molekul glukosa : 180
- Konsentrasi produk (gula pereduksi) :

$$y = 0,042x - 0,003$$

$$0,0515 = 0,042x - 0,003$$

$$x = 1,2976 \mu\text{g/ml}$$
- Aktivitas enzim : $\frac{[\text{gula pereduksi}] \times V_1 \times 10^3 \mu\text{mol}}{\text{BM} \times V_2 \times T}$

$$= \frac{1,2976 \times 4,5 \times 10^3 \mu\text{mol}}{180 \times 0,5 \times 60}$$

$$= 1,0813 \text{ U/ml}$$

BIODATA PENULIS



Penulis dilahirkan di Mojokerto, 13 Agustus 1989. Merupakan anak terakhir dari 3 bersaudara dari pasangan Mochamad Anshori dan Sumini. Memulai pendidikan di Sekolah Dasar Gempolkerep II, SMPN 1 Gedeg Mojokerto dan SMAN I Gedeg, Mojokerto. Setelah lulus dari SMAN I Gedeg Mojokerto pada tahun 2007, Penulis mengikuti SPMB dan diterima di Jurusan Biologi FMIPA-ITS pada tahun 2007. Di Jurusan Biologi ini Penulis mengambil Bidang Studi Mikrobiologi khususnya Mikologi.

Penulis sempat aktif di beberapa organisasi diantaranya JMMI ITS, KAMMI komisariat ITS, FSLDK dan FKIQ Biologi ITS . Penulis berharap karya tulis ilmiahnya tentang aktivitas selulase ini dapat memberi kontribusi bagi kejayaan umat. Contac Person Penulis : moeslem165@gmail.com